

Trabalho Conclusão Curso

Hugo Bayer Reichmann

PAPEL DO CÓRTEX INFRALÍMBICO NA FORMAÇÃO DE MEMÓRIAS CONTEXTUAIS AVERSIVAS EM RATOS

Florianópolis

2018

Hugo Bayer Reichmann

**PAPEL DO CÓRTEX INFRALÍMBICO NA FORMAÇÃO DE
MEMÓRIAS CONTEXTUAIS AVERSIVAS EM RATOS**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em
Ciências Biológicas do Centro de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito para a obtenção do Título
de Bacharel em Ciências Biológicas
Orientador: Prof. Dr. Leandro José Bertoglio

Florianópolis

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Reichmann, Hugo Bayer

PAPEL DO CÓRTEX INFRALÍMBICO NA FORMAÇÃO DE MEMÓRIAS
CONTEXTUAIS AVERSIVAS EM RATOS / Hugo Bayer Reichmann ;
orientador, Leandro José Bertoglio, 2018.
66 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis,
2018.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Farmacologia. 3. Aprendizado
e memória. 4. Córtex infralímbico. 5. Condicionamento
aversivo. I. Bertoglio, Leandro José. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas.
III. Título.

Hugo Bayer Reichmann

PAPEL DO CÓRTEX INFRALÍMBICO NA FORMAÇÃO DE MEMÓRIAS CONTEXTUAIS AVERSIVAS EM RATOS

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas e aprovado em sua forma final pelos membros titulares da banca

Florianópolis, 14 de novembro de 2018.

Prof. Carlos Roberto Zanetti, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Leandro José Bertoglio (Universidade Federal de Santa Catarina)
Presidente da Banca - Orientador

Prof. Dr. Antônio de Padua Carobrez (Universidade Federal de Santa Catarina)
Membro Titular

Prof. Dr. José Marino-Neto (Universidade Federal de Santa Catarina)
Membro Titular

Dr. Felipe Vanz (Universidade Federal de Santa Catarina)
Membro Suplente

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, que sempre estiveram ao meu lado e me apoiaram como fosse preciso. A minha família, agradeço pelos bons momentos compartilhados, em especial a minha Vó Mathilde, minhas irmãs, sobrinhas e sobrinho.

Ao meu orientador, professor Dr. Leandro José Bertoglio, que abriu as portas de seu laboratório para mim e me ensinou muito sobre diversos aspectos do mundo acadêmico.

Aos colegas que estiveram no laboratório comigo durante o período em que realizei este trabalho: Rafael, Fernanda Marin, Ana, Marina, Fernanda Troyner, Marcelo, Felipe, Jaque, Bárbara, Rebecca e Daphany.

Aos professores e amigos que conheci no curso de C. Biológicas, em especial, aqueles que compuseram comigo as bandas Somitos e Cosmic Void. Ao PET Biologia e ao Sporum, e a todos os amigos que fiz lá. Muito obrigado também aos amigos que comigo compartilham momentos intensos cheios de adrenalina e contemplação escalando as rochas de Santa Catarina: Franco, Renzo, Federico e João. A Lara, minha companheira que tanto me ajudou em minha jornada e torna minha vida sempre mais doce.

Aos professores doutores Antônio de Padua Carobrez e José Marino-Neto e ao doutor Felipe Vanz, por aceitarem compor a banca e colaborar na construção deste trabalho.

Por último, agradeço aos grandes investimentos em educação, ciência e tecnologia realizados pelo governo brasileiro nos anos anteriores, que acabaram por consequência me provendo de três bolsas ao longo da minha graduação, dos seguintes órgãos: MEC, CAPES e CNPQ, fica aqui meu agradecimento ao esforço destas instituições. Infelizmente, recentemente a universidade pública parece estar sofrendo um desmonte, refletido em muitos cortes de bolsas e descontinuação ou abandono de inúmeros programas e instituições vinculados as universidades públicas - fica aqui meu agradecimento àqueles que ainda lutam para que isso não aconteça.

“A man that flies from his fear may find that he has only taken a shortcut to meet it”.

(J.R.R. Tolkien)

RESUMO

A formação e manutenção de memórias são de grande importância e guiam o comportamento da maioria dos animais. Diversas regiões encefálicas atuam de forma coordenada para que esses processos aconteçam de maneira adequada. A atividade do córtex infralímbico (IL), uma sub-região do córtex pré-frontal medial, é necessária para a aquisição e consolidação de memórias de extinção em roedores, entretanto, sua influência sobre a formação de memórias aversivas ainda não está completamente elucidada. Assim, o objetivo do estudo foi investigar o papel do córtex IL de roedores durante as fases de aquisição e consolidação, através do condicionamento aversivo ao contexto (CAC). Além disso, uma segunda parte do trabalho foi dedicada ao entendimento das relações de homologia entre o córtex IL de roedores e as regiões corticais de humanos, e ao surgimento destas estruturas ao longo da evolução. O agonista GABAérgico muscimol (MUS) foi injetado no IL através de cânulas-guia, implantadas por cirurgia estereotáxica, para inativar essa região de maneira transitória em diferentes etapas do processamento mnemônico (aquisição ou consolidação). Inicialmente, a infusão intra-IL de MUS ou veículo (VEI), 20 min antes da sessão de condicionamento, não teve nenhum efeito sobre a expressão de congelamento no contexto pareado (teste A), mas aumentou a expressão de congelamento no contexto não pareado (teste B), sugerindo que a atividade do IL durante a aquisição de memórias aversivas é necessária para garantir especificidade adequada. No segundo experimento, MUS ou VEI foi injetado no IL imediatamente após a sessão de condicionamento, interferindo, assim, com a consolidação da memória. Novamente, não houve diferenças no Teste A, mas o grupo tratado com MUS expressou níveis de congelamento significativamente maiores no Teste B quando comparado ao grupo VEI. No terceiro experimento, MUS ou VEI foi injetado no IL 6 horas após o condicionamento, num momento onde se acredita que a etapa da consolidação já estaria concluída. De fato, não houve mais diferença significativa entre os grupos nos testes B, sugerindo que os efeitos observados no experimento anterior são tempo-dependentes. Quando os animais foram submetidos a um CAC de menor intensidade, os resultados observados foram semelhantes aos dos experimentos anteriores, ou seja, o grupo tratado com MUS expressou níveis significativamente maiores de congelamento do que o grupo VEI apenas no teste B. Em conjunto, esses resultados sugerem que o IL modula a especificidade da memória contextual durante sua aquisição ou consolidação, sendo que a intensidade da memória não é um fator decisivo para tal ação. Por fim, o último experimento avaliou o efeito de uma inativação do IL

durante a consolidação sobre a extinção posterior. Os resultados deste experimento mostram que a atividade do IL durante a consolidação de memórias contextuais aversivas é necessária para que a extinção ocorra de maneira eficaz posteriormente, já que o grupo MUS expressou níveis significativamente maiores de congelamento no teste A realizado após a sessão de extinção. Em conjunto, os dados apontam novas tarefas associadas ao funcionamento do IL, e que sua atividade íntegra é necessária para a formação de memórias aversivas específicas e susceptíveis a extinção.

Palavras-chave: córtex infralímbico, condicionamento aversivo ao contexto, generalização, extinção.

ABSTRACT

The formation and maintenance of memories are some of the most important physiological processes for animal behavior regulation. For this processing, several brain regions are required, and their activity can modulate it. In rodents, the infralimbic (IL) cortex is one of these brain regions, having its activity being associated with learning and consolidation of fear extinction in many studies, however, its influence over acquisition or consolidation of contextual fear memories is not fully understood. Thus, the aim of this study was to investigate the IL's role in the acquisition and consolidation of aversive memories in a contextual fear conditioning (CFC) paradigm. Besides, another section of this study was dedicated to commenting on the homology relations between IL and vmPFC and their evolution. In our experiments, muscimol (MUS), a GABA-A agonist, was injected directly in the IL, through guide cannulae surgically implanted, in order to transiently inactivate this brain region in different stages of memory processing (acquisition or consolidation). In all experiments, in the days following the CFC, animals were tested in the same context (test A) or in a novel one (test B). Initially, MUS or vehicle (VEH) was bilaterally injected into the IL 20 min before CFC, interfering with the acquisition of contextual fear memories. On test A, no differences were observed between groups, while in test B, MUS-rats expressed a significantly higher freezing level compared to VEH-rats, suggesting that activity in the IL during acquisition is necessary for the encoding of specific contextual fear memories. In the second experiment, MUS or VEH was injected into the IL immediately after CFC, to interfere with memory consolidation. As on the first experiment, no differences were found between groups on test A, but on test B the MUS group expressed significantly higher freezing levels when compared to VEH. In the next experiment, MUS or VEH was injected into the IL 6 h after the CFC, in a moment in time when the crucial processes of consolidation are thought to have already occurred. No differences were found in test B, suggesting that the previously found results are time-dependent. When animals were trained in a lower intensity CFC, the results converge with the first two experiments, that is, MUS-treated rats expressed significantly higher freezing levels than VEH-treated rats only in test B. Along with the previous experiments, the results suggest that the nature of the IL control over consolidation does not rely on training intensity. Finally, the last experiment assessed the effect of an IL inactivation during consolidation over subsequent extinction learning. The results suggest that IL activity during consolidation of contextual fear memories is necessary for the successful posterior extinction, as MUS-rats expressed significantly higher

freezing levels in the post-extinction test A. Together, our results suggest new roles associated with IL's activity during memory formation, and that its activity during contextual fear memory formation is necessary for posterior specificity and susceptibility to extinction.

Keywords: contextual fear conditioning, extinction, fear generalization, infralimbic cortex

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas iniciais da formação de memórias de longa duração.....	6
Figura 2. Condicionamento aversivo ao contexto.....	19
Figura 3. Circuito neural do condicionamento aversivo.....	20
Figura 4. O córtex pré-frontal medial do rato.....	21
Figura 5. A filogenia dos vertebrados e a morfologia básica do cérebro em diferentes classes, com representações esquemáticas das regiões homólogas no telencéfalo.....	24
Figura 6. Córtex pré-frontal de humanos e nidopálio caudolateral de aves.....	26
Figura 7. Desenvolvimento filogenético do córtex cerebral, com comparação entre diversas espécies.....	28
Figura 8. Organização cortical no córtex pré-frontal (CPF) de humanos e roedores.....	29
Figura 9. Organização cortical no córtex pré-frontal medial (CPFm) de humanos e roedores..	30
Figura 10. Protocolo básico de condicionamento aversivo ao contexto (CAC) utilizado neste trabalho.....	37
Figura 11. A inativação temporária do córtex infralímbico (IL) durante a aquisição de memórias contextuais aversivas aumenta a expressão de congelamento perante o contexto não pareado.....	39
Figura 12. A inativação temporária do córtex infralímbico (IL) após o condicionamento aversivo ao contexto (CAC) aumenta a expressão de congelamento perante o contexto não pareado.....	40
Figura 13. A inativação temporária do córtex infralímbico (IL) 6 h após o condicionamento aversivo ao contexto (CAC) não é capaz de interferir com as respostas nos testes A e B.....	42
Figura 14. A inativação temporária do córtex infralímbico (IL) após treino moderado aumenta a expressão de congelamento perante o contexto não pareado.....	43
Figura 15. A inativação temporária do córtex infralímbico (IL) após a sessão de condicionamento aversivo ao contexto (CAC) afeta a extinção subsequente.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: análise de variância

CAC: condicionamento aversivo ao contexto

CCA: córtex cingulado anterior

CPF: córtex pré-frontal

CPFm: córtex pré-frontal medial

CPFvm: córtex pré-frontal ventromedial

CVD: crista ventricular dorsal

EPM: erro padrão da média

GABA: *gamma-aminobutyric acid* (ácido gama-aminobutírico)

h: horas

IL: córtex infralímbico

kg: quilograma

LTP: *long term-potential* (potencialização de longo prazo)

MCP: matéria cinzenta periaquedutal

mm: milímetros

MUS: muscimol

NCL: nidopálido caudolateral

PL: córtex pré-límbico

TEPT: transtorno de estresse pós-traumático

VEI: veículo

µl: microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	CONCEITOS FUNDAMENTAIS E HISTÓRIA DO ESTUDO DA MEMÓRIA.....	15
1.2	O CONDICIONAMENTO PAVLOVIANO COMO ABORDAGEM PARA O ESTUDO DE MEMÓRIAS AVERISVAS.....	18
1.3	A NEUROBIOLOGIA DAS MEMÓRIAS AVERSIVAS: QUAL O PAPEL DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL?.....	19
1.3.1	<i>O circuito do condicionamento pavloviano e o envolvimento do córtex pré-frontal medial</i>	19
1.3.2	<i>O papel do córtex pré-frontal ventromedial na consolidação sistêmica e na generalização</i>	22
1.4	EVOLUÇÃO E ANATOMIA COMPARADA DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL: QUAIS SÃO AS RELAÇÕES DE HOMOLOGIA ENTRE CÓRTEX INFRALÍMBICO DE RATOS E REGIÕES DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE HUMANOS?.....	23
1.4.1	<i>Evolução do córtex cerebral nos vertebrados</i>	24
1.4.2	<i>O auge da especialização cortical: aves e mamíferos</i>	25
1.4.3	<i>O surgimento e evolução do neocórtex de mamíferos e suas subdivisões</i>	27
2	HIPÓTESE.....	32
3	OBJETIVOS	33
3.1	OBJETIVO GERAL.....	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	ANIMAIS.....	34
4.2	DROGAS.....	34
4.3	CIRURGIA ESTEREOTÁXICA.....	35
4.4	MICROINJEÇÃO CENTRAL.....	35
4.5	HISTOLOGIA.....	35
4.6	CONDICIONAMENTO AVERSIVO AO CONTEXTO.....	36
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
4.8	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	38

5	RESULTADOS.....	39
	5.1 Efeito da inativação temporária do córtex infralímbico (IL) durante a aquisição de memórias contextuais aversivas sobre a expressão de congelamento nos testes A e B.....	39
	5.2 Efeito da inativação temporária do córtex infralímbico após o condicionamento aversivo ao contexto sobre a expressão de congelamento nos testes A e B.....	40
	5.3 Efeito da inativação temporária do córtex infralímbico 6 h após o condicionamento aversivo ao contexto sobre a expressão de congelamento nos testes A e B.....	41
	5.4 Efeito da inativação temporária do córtex infralímbico após o treino moderado sobre a expressão de congelamento nos testes A e B.....	42
	5.5 Efeito da inativação temporária do córtex infralímbico (IL) após o condicionamento sobre a extinção de memórias contextuais aversivas.....	43
6	DISCUSSÃO.....	46
	6.1 AQUISIÇÃO E CONSOLIDAÇÃO.....	46
	6.2 EXTINÇÃO.....	48
	6.3 A INFLUÊNCIA DO CÓRTEX INFRALÍMBICO NO PROCESSAMENTO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS.....	50
	6.4 A EVOLUÇÃO DO CÓRTEX INFRALÍMBICO E SEU HOMÓLOGO NOS HUMANOS.....	52
7	CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	55
8	REFERÊNCIAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

A maioria dos animais possui a capacidade de formar memórias e evocá-las no futuro, o que permite a definição de estratégias perante estímulos já conhecidos ou semelhantes. O aprendizado das relações entre eventos aversivos e estímulos sensoriais que possam prever tais eventos é essencial para a sobrevivência e perpetuação da vida animal na terra (Maren, 2001). Para nós humanos, aprendizado e memória são importantíssimos desde o nascimento e durante todo nosso desenvolvimento, e aquilo que chamamos de individualidade ou de “eu” é construído de acordo com as memórias que formamos durante nossas vidas de maneira única e incessante.

1.1 CONCEITOS FUNDAMENTAIS E HISTÓRIA DO ESTUDO DA MEMÓRIA

Aprendizagem e memória são processos que permitem que os organismos adquiram e armazenem informações e as evoquem no futuro. Há mais de 120 anos, pesquisadores buscam entender melhor os mecanismos biológicos por trás deste processo que soa tão abstrato. Ainda no final do século XIX, o psicólogo alemão Hermann Ebbinghaus foi o primeiro pesquisador a desenvolver estudos sistemáticos sobre memória em humanos, quando descobriu o processo que ficou conhecido como “curva de esquecimento de Ebbinghaus”, que descreve como a evocação de memórias perde eficiência com o passar do tempo (Schacter et al., 1978). Já no começo do século XX, Richard Semon, um zoólogo alemão cunhou o termo “engrama”, definido como o conjunto de alterações que o sistema nervoso sofre ao codificar uma memória. Segundo Semon, quando um conjunto de pistas sensoriais se sobrepõe suficientemente com os estímulos que formaram a memória inicial, ocorre a “ecforia”, processo no qual o engrama sai de seu estado latente e, ao ativar-se, a memória é evocada (Josselyn et al., 2017). Além destes, outro passo crucial para o desenvolvimento do estudo da memória é o trabalho de Müller e Pilzecker, de 1900, onde se descobriu que fatores interferentes apresentados após o aprendizado alteram o processamento cognitivo, implicando assim na existência de uma janela temporal entre o aprendizado inicial e a estabilização da memória.

A este período transitório foi dado o nome de consolidação, e mais recentemente diversos estudos demonstraram que há uma complexa sinalização em nível molecular que é responsável pelo armazenamento de informações durante a consolidação. Essa sinalização envolve diversos eventos celulares, sendo transcrição gênica e síntese proteica fundamentais para a consolidação

(Flexner et al., 1967; Dudai, 2004). Quando eventos interferentes externos (como fármacos ou novos aprendizados) ou internos (como secreção hormonal ou estado interno) ocorrem durante um determinado período de tempo após a aquisição, eles normalmente alteram a natureza da memória recém-formada. Com base nisso pode-se definir a consolidação como o período em que a memória original permanece susceptível a interferentes externos (Dudai, 2004). Na figura 1, está mostrado um diagrama do processo de consolidação.



Figura 1: Etapas iniciais da formação de memórias de longa duração. Após o aprendizado (aquisição), a memória recém-formada ainda permanece lábil, sensível a interferentes. Após o período de consolidação, a memória é estabilizada em um traço permanente e pode ser evocada posteriormente. Retirado de Gazarini, 2015.

Outro conceito fundamental para a construção do conhecimento atual acerca da neurobiologia da memória é a plasticidade neural. As primeiras conjecturas a respeito do tema foram realizadas na década de 1940 por Donald Hebb, que idealizou que dentro de um grupo de neurônios interligados, aqueles que disparam juntos passam a fortalecer suas interações de maneira recíproca (Abbott & Nelson, 2000). Já na década de 1970, obteve-se a demonstração de que um fenômeno deste tipo ocorria no hipocampo de coelhos, e este ficou conhecido como potencialização de longa duração (LTP, do inglês *long term potentiation*) (Bliss & Lomo, 1973). Com o passar do tempo, o termo “plasticidade Hebbiana” também passou a ser utilizado para descrever quaisquer modificações sináptica de longa duração, sejam elas potencializadoras ou inibidoras da eficácia sináptica, e hoje em dia sabe-se que a LTP é fundamental para a manutenção de memórias de longa de duração (Abbott & Nelson, 2000). É importante notar que existe um espectro contínuo em termos de potencialização de sinapses, onde altas frequências de disparos sincronizados predizem a LTP, enquanto baixa frequência e sincronização de neurônios induz o que se conhece como depressão de longa duração (LTD, do inglês *long term depression*), e não apenas a LTP, mas o balanço entre LTP e LTD é essencial para o processamento adequado de memórias (Connor & Wang, 2015)

Apesar de serem armazenadas de forma estável, as memórias já consolidadas podem ter sua ecforia comprometida através do fenômeno conhecido como extinção, que ocorre quando sucessivas apresentações (ou uma única apresentação longa) do estímulo condicionado na ausência do estímulo incondicionado passam a gerar uma redução nos níveis de respostas condicionadas, possivelmente devido à formação de uma nova memória, capaz de se sobrepor a memória original, inibindo a expressão comportamental (Myers & Davis, 2007; VanElzakker et al., 2014).

Algo muito importante para o entendimento da natureza das memórias é o fenômeno conhecido como “generalização”. Ela é o processo no qual estímulos diferentes do original que foi condicionado são capazes de gerar respostas similares (Ghirlanda & Enquist, 2003). Sendo as memórias aversivas tão importantes para a manutenção da vida animal, na natureza a generalização destas memórias tem papel crucial. Isso ocorre porque raramente um mesmo estímulo aparece na natureza de maneira idêntica por mais de uma vez, assim, a habilidade de transferir o aprendizado da situação aversiva para situações similares é essencial (Ghirlanda & Enquist 2003; Ferrari et al., 2008; Dunsmoor & Murphy, 2015). A chance que uma memória possui de tornar-se generalizada está intimamente ligada à valência emocional desta, sendo que memórias formadas por estímulos mais aversivos têm uma maior tendência de generalização (Ghirlanda & Enquist, 2003; Gazarini et al., 2015; Ghosh & Chattarji, 2015). Isso é de extrema utilidade do ponto de vista biológico, já que quanto mais biologicamente importante o estímulo é para um organismo, maior é o grau de atenção que o organismo deve dar para pistas que se assemelhem a ele, e nestes casos é mais válido obter um falso positivo do que um falso negativo, já que os custos associados a não responder para o estímulo correto são maiores (Ghosh & Chatatarji, 2015). Ou seja, para uma presa, é mais proveitoso fugir numa situação onde não há predador do que não fugir numa situação onde o predador está de fato ali, já que no falso positivo a consequência é apenas a necessidade de parar o forrageamento (busca por recursos), enquanto que para o falso negativo a “punição” é um enfrentamento com o predador, que pode significar a morte da presa.

Outro fator que interfere com o grau de generalização das memórias é a idade delas. Tanto em humanos quanto em roedores, memórias recentes tendem a ser mais específicas, e memórias remotas são normalmente mais generalizadas (Frankland & Bontempi, 2005; Wiltgen & Silva, 2007). Isso provavelmente se deve ao processo conhecido como “consolidação sistêmica”, que consiste na diminuição de dependência do hipocampo (estrutura importante na consolidação de

memórias) e aumento na dependência cortical para a evocação de memórias que ocorre com o passar do tempo (Dudai, 2012).

Contudo, o grau de generalização da resposta precisa de um ajuste fino, e quando o a expressão comportamental dos aprendido passa a ser generalizada para situações muito diferentes da original, isso pode ser mal adaptativo. A generalização excessiva de memórias aversivas pode impedir que um animal organize seu comportamento de maneira adequada, o que no ambiente natural acarreta em problemas de forrageamento (Ghirlanda & Enquist, 2003; Addicott et al., 2017), e em humanos, a generalização excessiva está envolvida no desenvolvimento de vários transtornos psiquiátricos, como o transtorno de ansiedade de generalizada (Lissek et al., 2014), e transtorno de estresse pós-traumático (Lissek et al., 2015). Em estudos com animais, entretanto, é importante ressaltar que apesar dos modelos nos darem ótimas pistas sobre a patofisiologia de diversas doenças, não estamos lidando com a doença em si.

1.2 O CONDICIONAMENTO PAVLOVIANO COMO ABORDAGEM PARA O ESTUDO DE MEMÓRIAS AVERISVAS

Para o estudo de memórias aversivas associativas, o protocolo mais amplamente utilizado é o do condicionamento clássico, descrito inicialmente por Ivan Pavlov em 1927, que consiste no pareamento de estímulos neutros ou inócuos com estímulos incondicionados (EI), sendo estes salientes por si só. Assim, após o condicionamento, os indivíduos passam a responder para o estímulo que antes era neutro com um padrão similar de respostas que apresentam para o EI, e o estímulo antes neutro passa a ser o estímulo condicionado (EC).

O condicionamento pavloviano ou “clássico”, como ficou conhecido, é capaz de gerar aprendizado associativo nos mais diversos organismos: há evidências em artrópodes (Watanabe & Mizunami, 2007; Szyszka et al., 2011; Galili et al., 2011), moluscos (Hawkins & Byrne, 2015), peixes anfíbios (Zavala, 1968); répteis (Davidson & Richardson, 1970), aves (Longo et al., 1962), e é claro, existe uma vasta literatura sobre condicionamento clássico em mamíferos. Por essas e outras razões, o condicionamento pavloviano é um método muito utilizado ao redor do mundo para estudar o processamento de memórias aversivas em nível comportamental e neurobiológico.

Utilizando condicionamento clássico, há diferentes formas de realizar o condicionamento, sendo que se pode utilizar condicionamento à contextos, quando os indivíduos simplesmente são expostos a um contexto e então recebem estímulos

incondicionados, e pode-se também usar condicionamento à pistas específicas, como por exemplo tons sonoros, ou odores específicos. Os dois modos de condicionamento diferem não só no protocolo comportamental, mas também no substrato neural envolvido (Kheirbek et al., 2010). Além disso, também há uma dissociação entre condicionamentos apetitivos e aversivos, tanto no tipo de associação formada quanto nas bases neurais envolvidas (Gottfried et al., 2002), sendo os condicionamentos apetitivos aqueles que envolvem recompensas e os aversivos aqueles que envolvem estímulos nocivos.

Quando se estuda memórias aversivas, grande parte dos estudos é realizada utilizando choques nas patas como EI, e sons, odores, luzes ou contextos como EC, e a principal medida comportamental avaliada nos testes é o tempo de congelamento (*freezing*), caracterizado pela imobilidade dos animais quando se deparam com o EC após o condicionamento (Blanchard & Blanchard, 1969). Um dos protocolos de condicionamento mais utilizados é o condicionamento aversivo ao contexto, exemplificado na figura 2.

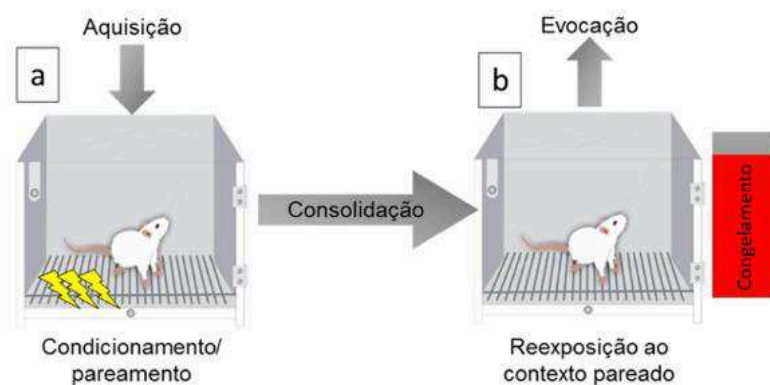


Figura 2: Condicionamento aversivo ao contexto. A) sessão de condicionamento, onde o estímulo neutro (contexto) é pareado com o estímulo incondicionado (choques), tornando-se assim, o estímulo condicionado. B) sessão de evocação, na qual o contexto passa a evocar respostas condicionadas, mesmo sem a presença do choque. Adaptado de Troyner, 2017.

1.3 A NEUROBIOLOGIA DAS MEMÓRIAS AVERSIVAS: QUAL O PAPEL DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL?

1.3.1 O circuito do condicionamento pavloviano e o envolvimento do córtex pré-frontal medial

Em mamíferos, é necessária a ativação coordenada de diversas regiões encefálicas para que as memórias aversivas possam ser formadas e posteriormente evocadas. Para a codificação de memórias aversivas através do condicionamento pavloviano, é necessário que o EI seja percebido, e o sinal gerado deve ascender através da matéria cinzenta periaquedutal (MCP) e tálamo para promover a ativação conjunta de regiões corticais, hipocampo, amígdala e hipotálamo (Gross & Canteras, 2012). A atividade em algumas regiões, como amígdala e MCP, parece ser essencial para a maioria dos protocolos de condicionamento aversivo, pois seriam estas as responsáveis por sinalizar ameaças ou estímulos aversivos (Maren, 2001; Gross & Canteras, 2012; Pellman & Kim, 2016), enquanto o hipocampo seria necessário principalmente para condicionamento contextual (Maren, 2001; Gross & canteras, 2012). Já as regiões corticais parecem atuar como reguladores “descendentes” na expressão e atenuação de respostas defensivas (Sotres-Bayon & Quirk, 2010; Pellman & Kim, 2016).

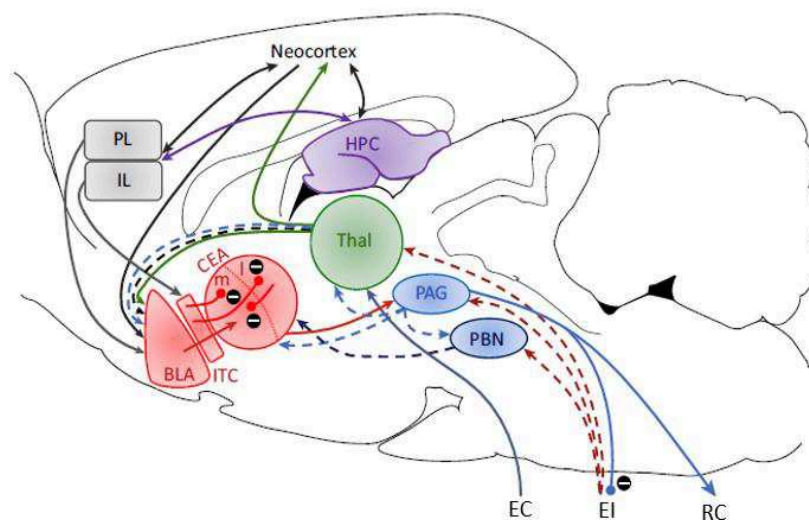


Figura 3: Circuito neural do condicionamento aversivo. A) Durante o condicionamento auditivo, o estímulo condicionado chega na amígdala pela via direta (talâmica) e indireta (tálamo-cortical), enquanto o estímulo incondicionado (choque) atinge a amígdala pelas ascendentes da dor. O Pareamento entre EC e EI é formado por um mecanismo dependente de LTP, que fortalece a conexão entre as sinapses estimuladas pelo EC e a amígdala. Abreviações: **BLA:** amígdala basolateral; **CEA:** núcleo central da amígdala; **EC:** estímulo condicionado; **EI:** estímulo incondicionado; **HPC:** hipocampo; **IL:** infralímbico; **ITC:** células intercalares da amígdala; **PAG:** matéria cinzenta periaquedutal (do inglês *periaqueductal gray*); **PBN:** núcleo parabraquial (do inglês *parabrachial nucleus*); **PL:** pré-límbico; **RC:** resposta condicionada; **Thal:** tálamo (do inglês *thalamus*). Adaptado de Pellman & Kim, 2016.

Há muito tempo já se tem a noção de que as áreas corticais controlam a atividade de regiões mais antigas, ainda no século XIX, havia a ideia de que regiões corticais eram capazes de “re-representar” representações realizadas por regiões subcorticais e assim regular sua atividade de um modo mais fino (Jackson, 1884; York & Steinberg, 2006). O envolvimento de estruturas corticais em processos mnemônicos vem sendo estudado desde os trabalhos clássicos de Pavlov e Lashley (Pavlov, 1927; Lashley, 1933). Durante o século XX, muito se descobriu sobre o envolvimento do córtex no aprendizado e memória, sendo que diversos estudos apontam que o córtex pré-frontal medial (CPFm) atua na regulação da aquisição de memórias aversivas, mas não é essencial para sua formação (Sotres-Bayon & Quirk, 2010).

O CPFm pode ser dividido em 3 regiões: córtex cingulado anterior (CCA); córtex pré-límbico (PL); e córtex infralímbico (IL) (Öngur & Price, 2000) (Figura 4). As três regiões podem ser distintas por seus padrões de conectividade, que conferem diferentes funcionalidades para essas três regiões (Heidbreder & Groenewegen, 2003; Saffari et al., 2016). Muitos estudos apontam para uma divergência funcional onde o PL seria responsável por guiar a expressão de respostas defensivas condicionadas enquanto o IL atuaria como um atenuador destas durante a extinção de memórias aversivas (Sotres-Bayon & Quirk, 2010). A principal base neuroanatômica que sustenta a dicotomia entre PL e IL é o padrão de conectividade com a amígdala: enquanto o PL envia projeções excitatórias para amígdala basolateral, o IL envia projeções para as células intercalares da amígdala, que são interneurônios GABAérgicos e portanto diminuem a atividade da amígdala central, responsável por evocar respostas defensivas (Vidal-Gonzalez et al., 2006).

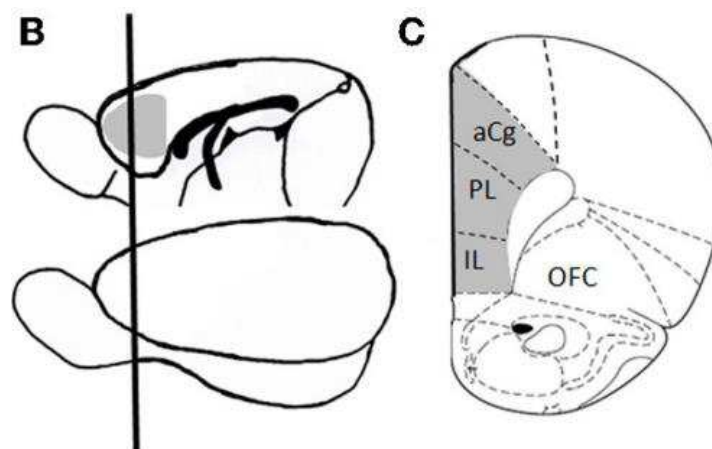


Figura 4: O córtex pré-frontal medial do rato. A) visão lateral do encéfalo de rato, com o CPFm em cinza B) visão coronal do CPFm de ratos. aCg: córtex cingulado anterior; PL: pré-límbico; IL: infralímbico. Adaptado de Bizon et al., 2012.

De fato, muitos estudos comportamentais empregando diversos protocolos encontram evidências para as funcionalidades propostas para o CPFm e para a dissociação das funções de suas sub-regiões. Enquanto a estimulação elétrica do PL durante a extinção de memórias aversivas aumenta a expressão de respostas defensivas durante a sessão e no teste realizado no dia seguinte, a estimulação do IL acelera a extinção e reduz os níveis de congelamento no dia seguinte (Vidal-Gonzalez et al., 2006). Em estudos sobre condicionamento apetitivo utilizando drogas de abuso como EI, o PL parece ser responsável por evocar a busca de drogas através da detecção de pistas associadas, enquanto o IL parece atuar como supressor destas respostas (West et al., 2014). No que diz respeito à flexibilidade comportamental, o PL e o IL também parecem possuir papéis antagônicos quando há uma situação que demanda a escolha de uma nova estratégia em detrimento de outra pré-estabelecida, o IL seria o responsável pela mudança de postura, enquanto a hiperativação do PL leva a uma menor flexibilidade (Mukherjee & Caroni, 2018).

Deste modo, parece haver uma distinção funcional do CPFm no sentido dorso ventral (Heidbreder & Groenewegen, 2003), sendo que o até mesmo dentro do PL, que é a região intermediária do CPFm, há grande variação citoarquitetônica e funcional quando compara-se sua porção mais ventral com a mais dorsal (Saffari et al., 2016). Deste modo, o CPFm parece possuir um gradiente dorso-ventral onde as regiões mais dorsais (CCA e PL) atuam promovendo respostas defensivas e a mais ventral (IL) atua na supressão das mesmas (Heidbreder & Groenewegen, 2003; Saffari et al., 2016). Mais sobre a anatomia e distinções funcionais do CPFm de ratos e seus homólogos no humano serão apresentados na seção 1.4.

1.3.2 O papel do córtex pré-frontal ventromedial na consolidação sistêmica e na generalização

O arcabouço estabelecido na literatura sustenta a ideia de que memórias contextuais recém formadas são hipocampo-dependentes, enquanto as memórias de longo prazo tornam-se dependentes de regiões corticais para serem evocadas, mas ao mesmo tempo acredita-se que durante a formação inicial da memória, módulos corticais já são recrutados para permitir que a consolidação sistêmica se dê (Frankland & Bontempi, 2005). Além disso, o “*replay neuronal*” (que consiste no disparo em conjunto de redes cortico-hipocampais que foram recrutados no momento da codificação da memória) parece ser responsável pela consolidação e armazenamento da memória (Karlsson & Frank, 2009). Ainda neste sentido, a visão atual é de

que o CPFvm de fato não é necessário para armazenar a memória do condicionamento inicial, mas seu grau de atividade parece atuar como um modulador dos atributos da memória durante sua formação (Nieuwenhuis & Takashima, 2011).

No que diz respeito à especificidade mnemônica, há evidências em humanos de que a atividade neuronal do CPFvm é responsável pela supressão de respostas generalizadas (Onat & Büchel, 2015) e a conectividade entre o CPFm e o hipocampo parece ser importante durante o aprendizado para garantir tal especificidade (Berkers et al., 2016). Dentre as características do CPFm que o colocam como peça central no processamento da especificidade mnemônica, está seu controle sobre a atividade do hipocampo durante a aquisição e consolidação, que se dá através do núcleo reuniens do tálamo (Xu & Südhof, 2013; Troyner et al., 2018).

Apesar das evidências apontarem para o CPFm como um supressor de respostas generalizadas, novamente há a necessidade de considerar suas sub-regiões quanto a seu controle sobre a expressão generalizada de respostas defensivas. A ativação das regiões dorsais do CPFm (CCA e PL) parecem suportar tanto o aumento de generalização observado no decorrer da consolidação sistêmica (Cullen et al., 2015), quanto a formação de memórias mais robustas e generalizadas (Vanvossen et al., 2017). Em contrapartida, o IL parece atuar como um supressor das respostas generalizadas no condicionamento aversivo ao contexto (Zelikowsky et al., 2013) e é necessário para que aconteça a discriminação contextual no condicionamento contextual apetitivo (Ashwell & Ito, 2014). Assim, o controle da generalização de memórias é mais uma das funcionalidades que apresenta a distinção dorso-ventral já citada anteriormente (Spalding, 2018). Como esta mais é uma das evidências da analogia entre o IL em roedores e o CPFvm de humanos, faremos uma análise mais aprofundada adiante, ver seção 1.4.

1.4 EVOLUÇÃO E ANATOMIA COMPARADA DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL: QUAIS SÃO AS RELAÇÕES DE HOMOLOGIA ENTRE CÓRTEX INFRALÍMBICO DE RATOS E REGIÕES DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE HUMANOS?

A literatura atual não é totalmente clara sobre as relações de homologia entre IL de roedores e regiões corticais em humanos (Nieuwenhuis & Takashima, 2011; Myers-Schulz & Koenings, 2012). Como o IL é uma região muito associada ao controle emocional e atividades cognitivas, os estudos que sugerem homologia normalmente se atem a dados experimentais na área de neurociência comportamental. Entretanto, uma semelhança funcional não implica em homologia, e sim uma origem comum (Havstad et al., 2015). Assim, a anatomia comparada e

evolutiva é um método mais efetivo, senão o único válido para traçar as relações reais de homologia (Ghiselin, 2015). Deste modo, para entender as relações de homologia entre o IL de roedores e regiões do córtex humano, é importante entender como se deu a evolução do córtex cerebral como um todo, especialmente do neocórtex de mamíferos, com enfoque no córtex pré-frontal (CPF) e seus homólogos e análogos.

1.4.1 Evolução do córtex cerebral nos vertebrados

Estudos de anatomia comparada apontam para uma diferenciação inicial do pálio cerebral em dorsal, medial e lateral a partir do surgimento dos vertebrados (Aboitiz et al. 2002; Tissir et al. 2002; Naumann et al. 2015), em estudos de anatomia comparada, o termo “pallium”, ou pálio, diz respeito a camada mais superficial do cérebro, sendo muitas vezes sinônimo de córtex. Ao longo da evolução dos vertebrados, os grupos de animais acabaram por desenvolver diversas adaptações em seus cérebros, sendo que nos diferentes táxons, diferentes arquiteturas cerebrais foram fixadas (Naumann et al., 2015). Entretanto, o plano básico que divide o cérebro em telencéfalo, mesencéfalo e cerebelo se mantém ao longo de todas as classes de vertebrados, apesar dessas três divisões apresentarem tamanhos relativos diferentes em diferentes classes (Naumann et al., 2015), e no telencéfalo há grande diversificação no que diz respeito a organização das camadas do pálio, no telencéfalo, como está ilustrado na figura 5.

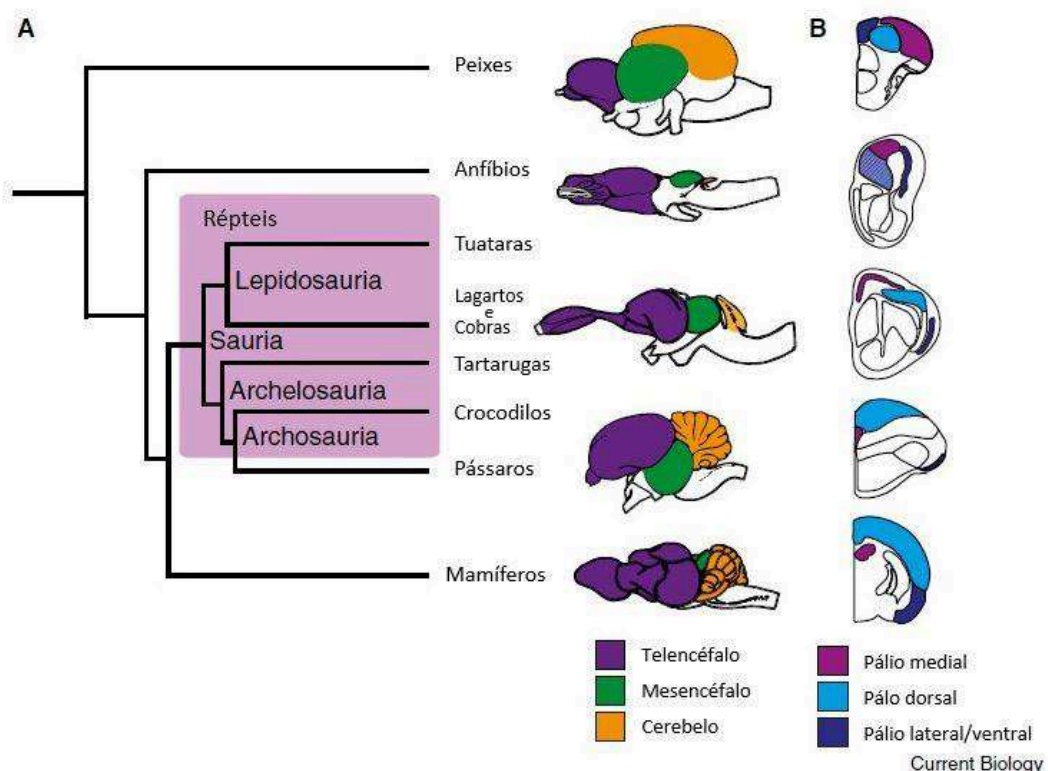


Figura 5: A filogenia dos vertebrados e a morfologia básica do cérebro em diferentes classes, com representações esquemáticas das regiões homólogas no telencéfalo. Em diferentes classes de vertebrados, o tamanho relativo das regiões cerebrais é diferente, e no telencéfalo há grande diversificação na organização do pálido. Adaptado de Naumann et al. (2015).

De maneira interessante, algumas destas regiões parecem exercer funções semelhantes apesar de não serem homólogas. É o caso do neocórtex em mamíferos, e da crista ventricular dorsal (CVD) em conjunto com a região de “Wulst” em aves, que surgiram e evoluíram de maneira convergente para gerar a complexidade estrutural necessária para executar comportamentos complexos como tomada de decisão, resposta a estímulos condicionados e comportamento direcionado à alvos (Aboitiz et al. 2002; Güntürkün, 2005, 2011; Nieder, 2017).

1.4.2 O auge da especialização cortical: aves e mamíferos

Aves e mamíferos são grupos de vertebrados que devem grande parte de seu sucesso evolutivo aos seus talentos cognitivos (Güntürkün, 2005), sendo que aves e primatas possuem números similares de neurônios quando se considera o telencéfalo como um todo (Olkowicz et al. 2016), entretanto, o substrato neural que possibilita estes comportamentos em aves e mamíferos é bastante diferente. Em mamíferos, o neocórtex, que é a maior parte do pálido, possui camadas laminares, diversas circunvoluções, e nas aves, as camadas superiores do pálido não apresentam camadas laminares, e podem ser divididas em região de “Wulst” e CVD (Butler et al. 2012). Em meio às dificuldades em traçar uma filogenia definitiva para o córtex entre os amniotas, duas teorias de diversificação palial nas aves surgiram: uma que sugere que as camadas de células presentes na região de “Wulst” e CVD são homólogas às regiões neocorticais de mamíferos, proposta por Karten em 1969, conhecida como hipótese neocortical, enquanto uma segunda teoria, proposta por Bruce e Neary em 1995, propõe que toda a CVD foi originada a partir de células homólogas as da amígdala basolateral de mamíferos, que é a porção amigdalar que recebe aferentes do tálamo, sendo esta conhecida como hipótese claustramigdalar (Butler et al. 2012).

Uma região de interesse especial no pálido é o nidopálido caudolateral (NCL), que possui grande semelhança estrutural e funcional com o CPF de mamíferos. Do ponto de vista estrutural, há uma grande semelhança no que diz respeito a aferentes dopaminérgicos da área tegmental ventral e *substantia nigra*, onde terminais dopaminérgicos ativam neurônios

piramidais através de receptores D1, porém há diferença na modulação dopaminérgica de interneurônios GABAérgicos, já que no NCL estes não possuem receptores do tipo D1 (Güntürkün, 2005). Além disso, devido ao grande número de aferentes sensoriais e eferentes motores, o NCL aparece, assim como o CPF, como uma zona de convergência entre estímulos sensoriais e controle motor (Leutgeb et al. 1996). Uma diferença marcante entre NCL e CPF é a inervação aferente do tálamo, onde o CPF recebe principalmente aferentes do núcleo mediodorsal do tálamo, enquanto o NCL é innervado majoritariamente pelo núcleo dorsolateral posterior, que não é homólogo ao núcleo mediodorsal (Güntürkün, 2005), além disso, uma diferença clara entre as regiões é a localização anatômica no encéfalo, como mostrado na figura 6.

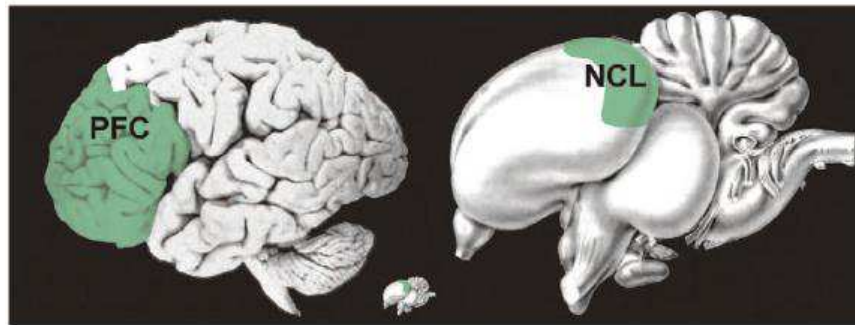


Figura 6: Córtex pré-frontal de humanos e nidopálio caudolateral de aves. Visão lateral dos cérebros do humano e do pombo. O córtex pré-frontal e o nidopálio caudolateral estão realçados em verde. O cérebro de pombo representado entre os dois cérebros em tamanho menor está na mesma escala do cérebro humano. Abreviações: **PFC:** Córtex pré-frontal; **NCL:** Nidopálio Caudolateral Adaptado de Güntürkün (2005).

Do ponto de vista funcional, aparecem diversas outras semelhanças, como o processamento de sequências temporais, o controle cognitivo sobre a flexibilidade comportamental, e a tomada de decisão (Güntürkün, 2005). Estudos recentes apontam ainda para o papel do NCL na codificação de relações entre estímulos e consequências (Starosta et al. 2013), diferenciação de estímulos condicionados e inócuos (Kasties et al. 2016), e na participação ativa na modulação de comportamento direcionado à alvos (Liu et al. 2017). De maneira contundente para a análise, o NCL também parece ser necessário para a aquisição de memórias de extinção em pombos: um estudo utilizando um paradigma de condicionamento apetitivo demonstrou que quando AP-5, um antagonista NMDA, é injetado no NCL antes do treino de extinção, há um prejuízo na extinção (Lengersdorf, 2015), novamente sugerindo uma analogia entre essa região e o neocórtex de mamíferos, já que é provável que nas aves o NCL

faça o papel exercido pelo IL em roedores e CPFvm em humanos no processamento da extinção.

1.4.3 O surgimento e evolução do neocórtex de mamíferos e suas subdivisões

Quando focamos nos mamíferos e no surgimento do neocórtex, há dificuldade em estabelecer quais seriam as regiões cerebrais que o originaram, já que em répteis (incluindo aves), vários dos tipos celulares e padrões conectômicos do neocórtex são inexistentes (Aboitiz et al. 2003). Entretanto, nota-se uma clara relação de homologia no pálio como um todo, já que nesses três grupos estão presentes tanto a formação hipocampal quanto o córtex piriforme (Aboitiz et al. 2003; Fuster, 2008). O néocortex de mamíferos em particular, parece ter surgido a partir de um desenvolvimento desproporcional das camadas de células situadas entre a formação hipocampal e o córtex piriforme, num mamífero basal, que gerou uma estrutura sem precedentes, com inúmeras circunvoluções, camadas laminares e contendo novas camadas de células granulares (figura 7), e a princípio, tal estrutura parece não possuir nenhuma homóloga fora do grupo dos mamíferos (Northcutt & Kaas, 1995; Aboitiz et al. 2003).

Entretanto, essa ausência de semelhanças nos cérebros de mamíferos e répteis adultos não necessariamente descarta a homologia. Assim como não se encontram os homólogos da maioria das regiões neocorticais de mamíferos nos répteis (incluindo aves) adultos, não se encontram homólogos de regiões corticais de aves no cérebro de mamíferos (Aboitiz et al. 2003). Porém, essas dificuldades comparativas podem decorrer de fatores de regulação embrionária e de desenvolvimento que fazem com que determinadas regiões, mesmo que homólogas, apresentem uma plasticidade fenotípica exuberante e pareçam ser totalmente distintas (Aboitiz et al. 2003).

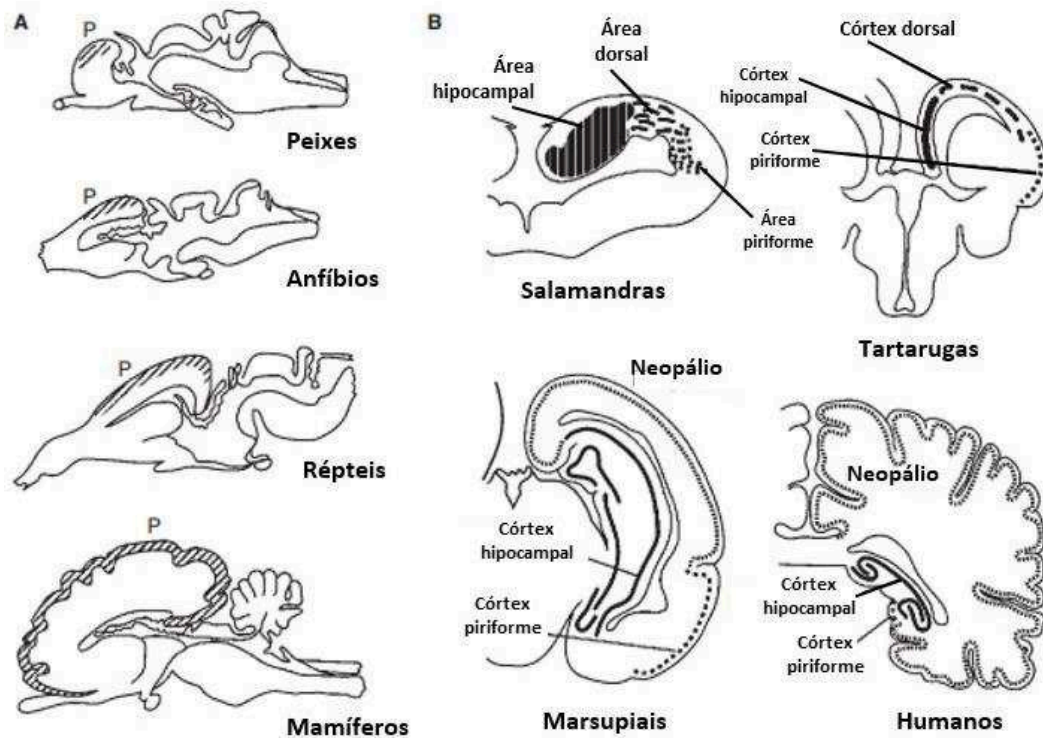


Figura 7: Desenvolvimento filogenético do córtex cerebral, com comparação entre diversas espécies. A) Secções cerebrais parassagitais em 4 classes de vertebrados; P = pálido. **B)** Secções coronais de salamandras, tartarugas, marsupiais e humanos. Adaptado de Fuster (2008).

Com o surgimento do neocórtex, o cérebro dos mamíferos ganha uma nova camada de complexidade para o processamento de informações sensoriais e interoceptivas. De um modo novo para os vertebrados, em mamíferos, todas as vias sensoriais convergem para chegar ao neocórtex, onde são integradas e redirecionadas para a amígdala e o hipocampo (Aboitiz et al. 2002). Incluído dentro do neocórtex, está o CPF, presente em todos os mamíferos, e atingindo seu maior grau de complexidade dentro da ordem dos primatas, especialmente no ser humano (Fuster, 2008).

O termo pré-frontal foi inicialmente cunhado nos trabalhos de Ferrier e Yeo no final do século XIX (Ferrier & Yeo, 1884; Carlén, 2017), e as primeiras descrições detalhadas da região foram feitas por Brodmann em 1909, sendo o CPF denominado de “*regio frontalis*”, e segundo Brodmann, sua citoarquitetura era única e esta região não apresentaria homólogos em não-primatas (Guldin, 1981; Carlén, 2017). Mais recentemente, definições modernas de CPF se atêm principalmente ao seu padrão diferencial de conectividade quando comparado a outras regiões do córtex cerebral, já que seria a porção do córtex que recebe aferentes dos núcleos mediodorsais do tálamo (Fuster, 2008; Carlén, 2017). Assim, esta definição para o CPF permite

identificá-lo em mamíferos como um todo, sendo que em diferentes espécies há variação na topologia e na estrutura interna e externa da região, mas a característica diagnóstica que seria a inervação aferente do tálamo mediodorsal segue presente ao longo da diversificação das diferentes ordens de mamíferos (Guldin, 1981). Entretanto, se descobriu que outros núcleos talâmicos também emitem projeções para o CPF, e que o núcleo talâmico mediodorsal projeta para outras estruturas corticais (Oh, 2014).

Na figura 8, adaptada de Carlén (2017), podemos observar as diferentes camadas do CPF em humanos e roedores, com enfoque para os tipos celulares predominantes nas diferentes regiões do CPF nos organismos avaliados. Em humanos, o CPF apresenta camadas granulares, disgranulares, pouco granulares e agranulares. Essa definição quanto ao tipo de córtex está associada à presença da camada 4, que é a camada granular do córtex cerebral, ou seja, os córtices agranulares não apresentam camada 4, os disgranulares ou levemente granulares apresentam camada 4 inconspícuas, enquanto nos córtices granulares, esta camada aparece de maneira clara (Carlén, 2017).

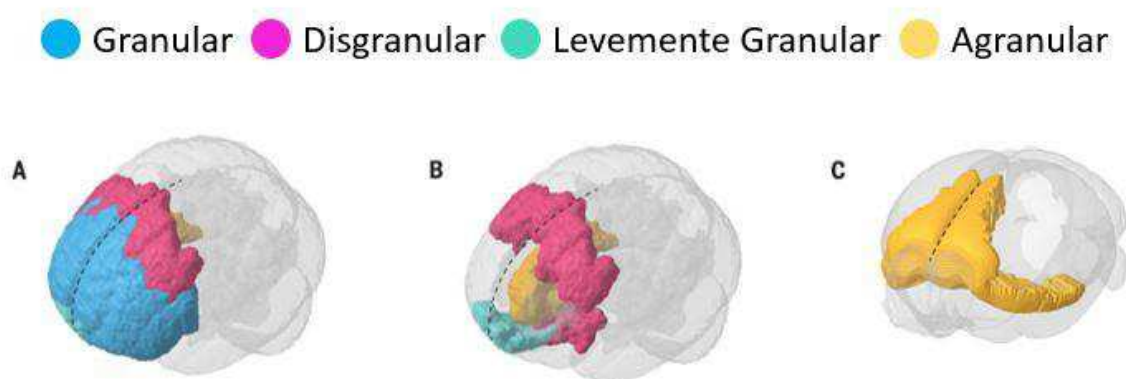


Figura 8: Organização cortical no córtex pré-frontal (CPF) de humanos e roedores. A e B) Vista lateral do cérebro humano. Ilustração esquemática dos quatro tipos corticais do CPF de humanos. C) Vista lateral do cérebro de roedores retratando o CPF agranular. A linha preta tracejada indica a linha sagital. Adaptado de Carlén (2017).

O CPF já foi estudado em diversos animais, e é dividido em subregiões, que apresentam terminologias diferentes de acordo com o foco dos estudos e critérios como citoarquitetura, conectividade e função (Wilson et al., 2010). Em macacos e humanos, se usa extensivamente o esquema cortical proposto por Brodmann, ainda em 1909 (Brodmann, 1909). Houve bastante discussão sobre a eficácia deste mapeamento para comparar resultados de estudos em diferentes espécies, mas adaptações foram feitas tornando o esquema mais robusto e capaz de guiar tais

comparações (Petrides et al., 2012). Mais especificamente, o córtex pré-frontal ventromedial (CPFvm), objeto de estudo desta análise, é dividido pelo esquema de Brodmann nas regiões 12, 24, 25 e 32 (Brodmann, 1909), e mais recentemente, nas regiões 10, 11, 14, 24, 25 e 32, sendo que a 32 pode ser encontrada dividida em 32pl e 32ac, correspondentes das regiões prélimbica (PL) e córtex cingulado anterior (CCA) em roedores (Ongur et al., 2003; Myers-Shulz & Koenings, 2012). O CPFvm em humanos é caracterizado como a face ventromedial do lobo frontal e a porção medial do córtex orbitofrontal (Mackey & Petrides, 2014).

Em ratos e camundongos, há certa dificuldade para estabelecer o homólogo ao CPFvm de humanos, devido a uma menor subdivisão de regiões e grandes diferenças estruturais e de citoarquitetura. Assim, normalmente se utiliza uma nomenclatura diferente em trabalhos com roedores, sendo que o termo córtex pré-frontal medial (CPFm) é muito mais empregado. Na figura 9, podemos observar as diferenças nas subdivisões da região ventromedial do córtex pré-frontal: em humanos, a região apresenta várias subdivisões, enquanto em roedores, normalmente se considera o CPFvm como uma porção do CPFm, sendo este composto por CCA, PL e IL, e CPFvm sendo composto por PL e IL (Myers-Shulz & Koenings, 2012; Bicks et al., 2015; Wallis et al., 2017). Entretanto, como já comentado, há uma dicotomia funcional entre PL e IL, sugerindo ainda uma subdivisão do CPFvm em roedores (Vidal-Gonzalez et al., 2006; Sierra-Mercado et al., 2011; Saffari et al., 2016).

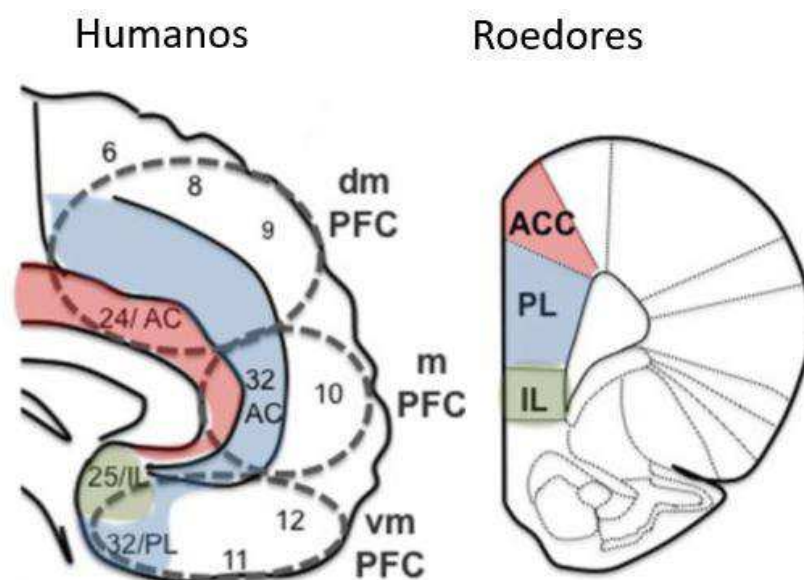


Figura 9: Organização cortical no córtex pré-frontal medial (CPFm) de humanos e roedores. A esquerda, estão representadas as subdivisões do CPFm de humanos, e a direita, de roedores. Os números no córtex humano representam a divisão atualizada das áreas de Brodmann, e as cores representam regiões homólogas segundo Bick

et al., 2015. Siglas: **dmPFC**: córtex pré-frontal dorsomedial; **mpPFC**: córtex pré-frontal medial; **vmPFC**: córtex pré-frontal ventromedial; **ACC**: córtex cingulado anterior; **PL**: pré-límbico; **IL**: infralímbico. Adaptado de Bicks et al. (2015).

Considerando a complexidade evolutiva apresentada pelo neocórtex de mamíferos, realmente é difícil estabelecer relações claras de homologia entre subregiões corticais. Apesar das dificuldades e contradições, alguns achados cruciais parecem apontar para a homologia entre IL e partes do CPFvm (em especial, área 25). Sabe-se que em humanos, essa região tem papel fundamental no aprendizado e evocação da extinção de memórias aversivas (Phelps et al., 2004; Milad et al., 2005; Milad et al., 2007), em especial, a área do córtex cingulado subgenual (Phelps et al., 2004), que está praticamente sobreposto a área 25 de Brodmann (Drevets et al., 2008). Em conjunto, diversos estudos em roedores já demonstraram que o IL é necessário e suficiente para extinção de memórias (Milad & Quirk, 2002; Peters et al., 2010; Do-Monte et al., 2015), e que esse papel na extinção se deve ao mesmo fator que coloca o CPFvm (principalmente área 25) na circuitaria da extinção: o padrão de conectividade com a amígdala. Tanto a região 25 em primatas, quanto o IL em roedores, são as principais origens de eferentes do CPF para as células intercalares da amígdala, que são interneurônios GABAérgicos que diminuem a atividade geral da amígdala central e portanto reduzem respostas defensivas quando ativos (Chiba et al. 2000; Freedman et al., 2000; Vertes, 2003; Do-Monte et al., 2015).

2. HIPÓTESE

De acordo com o conjunto de dados expostos na introdução, o córtex infralímbico (IL) de ratos é capaz de modular a extinção de memórias aversivas, no entanto, seu papel na formação (aquisição e/ou consolidação) de memórias contextuais aversivas ainda não está totalmente esclarecido. Assim, a hipótese de trabalho é de que a atividade do IL module alguns aspectos (ex: especificidade) durante a formação de memórias contextuais aversivas em ratos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do estudo foi investigar o papel do córtex infralímbico (IL) na formação de memórias contextuais aversivas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o papel do IL durante a aquisição e consolidação de memórias contextuais aversivas através da inativação farmacológica;
- Investigar o papel do IL durante a consolidação de memórias contextuais aversivas de diferentes intensidades, através da inativação farmacológica sobre memórias de intensidades variadas;
- Investigar o papel do IL durante a consolidação de memórias contextuais aversivas sobre a extinção realizada posteriormente;
- Revisar a literatura que trata da evolução do córtex cerebral e anatomia comparada do córtex pré-frontal, com um olhar mais detalhado sobre as possíveis relações de homologia entre IL e córtex pré-frontal ventromedial, para assim estabelecer relações mais coerentes entre estudos em humanos e outros animais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 86 ratos Wistar machos, com idade de 90 a 120 dias e pesando de 250-350 gramas durante os experimentos. As caixas-moradia onde os animais permaneceram contém serragem, abrigam 4-5 animais cada, tendo as seguintes dimensões: (36 x 30 x 15). Os ratos receberam água e ração *ad libitum* durante todo o período em que estiveram no biotério, e foram mantidos num ciclo claro/escuro de 12 h começando as 7:00 h, e a temperatura ambiente foi mantida em 21 ± 2 °C. Este estudo faz parte do projeto de número 9263110516, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC.

4.2 DROGAS

Muscimol (MUS; 4,0 nmol / 0,2 µL; Sigma-Aldrich, EUA), um agonista GABA_A, foi dissolvido em PBS. O Muscimol é uma droga muito utilizada como ferramenta na pesquisa básica em neurobiologia pois possui a capacidade de reduzir de maneira rápida e eficaz a atividade neuronal da região encefálica onde é injetado através da ativação de receptores ionotrópicos GABA_A, o que gera hiperpolarização nesses neurônios. Esses momentos de infusão foram escolhidos de acordo com a literatura que relata que o MUS é capaz de reduzir a atividade neuronal em mais de 80% a partir de 2 minutos após a infusão, atinge seu pico de efeito aos 25 minutos, e mantém a inativação por pelo menos 2 horas (Edeline et al., 2002), além do fato de que o efeito comportamental de injeções de MUS diretamente no IL já pode ser observado a partir de 10 minutos após a infusão (Slattery et al. 2011). A dose utilizada neste trabalho foi baseada em estudos prévios publicados pelo nosso laboratório (Stern et al., 2014; Troyner et al., 2018).

4.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Para a cirurgia estereotáxica, os ratos foram anestesiados com uma solução contendo xilazina (10mg/ml/kg) e ketamina (100mg/ml/kg). Já anestesiados, os animais tinham os pêlos da região dorsal da cabeça cortados e eram posicionados no centro do aparelho estereotáxico (Stoelting, EUA), fixados em barras auriculares. A assepsia do campo cirúrgico foi realizada com solução de álcool iodado 2%, e uma solução contendo lidocaína 3% e adrenalina 1:50000

(Dentsply Pharmaceutical, Brasil) foi injetada por via subcutânea no local antes da realização da incisão. Duas cânulas-guia de aço são implantadas, visando o IL, nas seguintes coordenadas a partir do Bregma: AP + 3,2 mm ; ML \pm 0,5 mm ; DV - 2,1 mm, obtidas a partir de consulta ao atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson (2007). As cânulas possuíam 11 mm de comprimento e foram confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas (22G; 25,0 x 7,0 mm). Ambas são fixadas no crânio com o auxílio de parafusos de aço e acrílico autopolimerizante e foram obstruídas com um mandril removível para evitar entupimento. Após a cirurgia os animais receberam o anti-inflamatório e analgésico Banamine® (2,5 mg/ml/kg), permaneceram numa cama aquecida por pelo menos 30 minutos após a cirurgia e então passaram por um período de recuperação de pelo menos 10 dias antes da infusão de drogas.

4.4 MICROINJEÇÃO CENTRAL

A microinjeção de drogas ou veículo no córtex IL foi realizada através de agulhas de 14 mm de comprimento, confeccionadas a partir de agulhas gengivais (30G, 31 mm) conectadas a um tubo de polietileno acoplado a uma microseringa (Hamilton, EUA) preenchida com água destilada. Uma bolha de ar foi mantida entre a água e a solução a ser injetada, permitindo a visualização do deslocamento da solução a ser injetada durante as infusões.

No momento da microinjeção o animal foi mantido imobilizado, o mandril foi removido e a cânula foi desobstruída com uma lima odontológica de 11 mm (Dentsply Ltda., Brasil). A agulha foi introduzida na cânula e a infusão foi realizada com o auxílio de uma bomba de infusão (Insight, Brasil), programada para injetar o volume de 0,2 μ L durante 60 segundos. Após a injeção, a agulha foi mantida em posição por mais 60 segundos para assegurar a infusão total da droga e reduzir o fluxo retrógrado da solução.

4.5 HISTOLOGIA

Ao término dos experimentos, os animais receberam uma solução anestésica de quetamina (100 mg/ml/kg) e xilazina (10 mg/ml/kg) por via intraperitoneal. Após atingirem o plano anestésico adequado, os animais receberam uma solução contendo cloral hidratado (30% p/v; 3 ml/animal; Vetec, Brasil) através de injeção intraperitoneal, seguida pela microinjeção central de corante azul de Evans (0,2 μ l), utilizando os mesmos parâmetros da infusão de MUS, para verificar o sítio de infusão. Os animais tiveram seus encéfalos removidos e conservados

individualmente em solução de formalina 10% por 48 h, sendo posteriormente transferidos para uma solução de sacarose 30% por, no mínimo, 48 h antes da realização dos cortes histológicos. Para a verificação do sítio de injeção da droga, cortes coronais de 10 µm de espessura foram obtidos utilizando um criostato (Leica CM 1850, Alemanha) a uma temperatura aproximada de -25 °C. Os cortes foram fixados em lâminas de vidro para microscopia, gelatinizadas. Os cortes foram comparados a diagramas do cérebro de ratos (PAXINOS; WATSON, 2007) e apenas os animais com histologia confirmada para o IL foram incluídos na análise estatística dos dados.

4.6 CONDICIONAMENTO AVERSIVO AO CONTEXTO

O condicionamento aversivo ao contexto (CAC) foi realizado em uma caixa retangular (35 x 20 x 30 cm), com paredes laterais e superior de alumínio e parede frontal de acrílico, assim como sua tampa, permitindo a visualização dos animais durante o teste. O piso gradeado, feito com barras de aço inoxidável (3 mm de diâmetro, com 9 mm de espaçamento) encontrava-se conectado a um gerador digital de choques elétricos (Insight, Brasil). Esta caixa foi denominada de contexto pareado ou contexto A. Uma segunda caixa quadrada (30 x 30 x 30 cm) feita inteiramente de vidro transparente e com uma tampa gradeada foi utilizada como contexto não pareado ou contexto B. Esse contexto apresenta pistas sensoriais diferentes daquelas apresentadas no contexto A e foi usado para medir o grau de generalização.

Os experimentos comportamentais foram realizados sob condições de luminosidade controlada (70 lux) e ocorreram entre 10:00 e 17:00 h. Cada animal passou por uma sessão de familiarização, na qual foi permitido explorar o contexto A livremente por 3 minutos. No dia seguinte, ocorreu a sessão de condicionamento, durante a qual os animais receberam, após 30s de livre exploração, 3 choques elétricos nas patas (1,0 mA, 60 Hz, por 3 s), com intervalo de 30 segundos entre cada choque, e então permaneceram na caixa por mais 30 s após o último choque antes do retorno à suas respectivas caixas-moradia, totalizando uma sessão de 2 minutos. No experimento em que os animais receberam um treino de menor intensidade, apenas 1 choque (de mesma intensidade) foi aplicado após os 30 segundos iniciais de exploração, sendo os animais retirados do contexto 30 segundos depois deste único choque, totalizando uma sessão de 1 minuto. Este condicionamento de menor intensidade será chamado neste trabalho de treino moderado, por gerar respostas defensivas menos intensas. Ambos os protocolos foram padronizados em estudos prévios do laboratório (Gazarini, 2015; Troyner, 2017).

Em todos os experimentos que visaram interferir na consolidação da memória recém-adquirida, os tratamentos foram feitos imediatamente após o condicionamento. Já no experimento que visou interferir com a aquisição da memória, a manipulação farmacológica foi realizada 20 minutos antes da sessão de condicionamento, para que o MUS atingisse seu pico de efeito durante o treino (Edeline et al., 2002).

Um dia após o CAC, os animais foram reexpostos ao contexto pareado (contexto A) durante 3 minutos, sem a apresentação de choques, para a evocação e avaliação comportamental da memória contextual aversiva (Teste A). Um dia depois, os animais foram expostos ao contexto não pareado (contexto B) durante 3 minutos, a fim de avaliar os níveis de congelamento perante um novo contexto, como um correlato da generalização da memória. Para as sessões de extinção, os animais foram reexpostos ao contexto pareado por um período de 20 minutos, que posteriormente foi analisado em 10 blocos de 2 minutos cada.

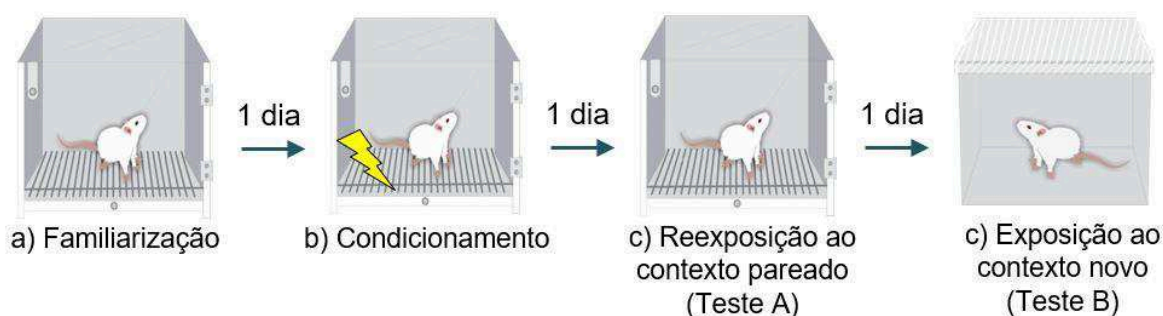


Figura 10. Protocolo básico de condicionamento aversivo ao contexto (CAC) utilizado neste trabalho. A) 24h antes das sessões de condicionamento, os animais foram familiarizados ao contexto que foi posteriormente pareado, sendo permitida sua exploração por 3 minutos. **B)** A sessão de CAC foi realizada com 1 (treino moderado) ou 3 choques (treino forte). **C)** A reexposição ao contexto pareado visou observar a retenção da memória, como uma medida de sua robustez, e a **D)** a exposição ao contexto não pareado 24h depois visou a observação do nível de congelamento perante um contexto não pareado, permitindo a verificação do grau de generalização da memória. Modificações nesse protocolo foram realizadas quando necessário para atingir o objetivo do experimento em questão e são apontadas no decorrer da descrição de resultados.

O tempo relativo de comportamento de congelamento (freezing) é comumente utilizado como uma medida das respostas defensivas em roedores, é um comportamento inato e pode ser definido como a ausência total de movimentos, exceto aqueles necessários para a respiração e vocalização do animal (Fanselow, 1980). Assim, o tempo de congelamento dos animais foi

quantificado, em segundos, a cada minuto das sessões de evocação e testes, sendo expresso em porcentagem do tempo total de cada sessão.

Todos os experimentos comportamentais foram gravados por uma câmera de vídeo acoplada a um aparelho de DVD, permitindo a posterior avaliação dos comportamentos. O experimentador permanecia na antessala, acompanhando o comportamento do animal através do monitor. A limpeza dos contextos, após o uso com cada animal, foi realizada com solução de etanol a 10% (v/v).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Após ter sido assegurada a distribuição normal dos dados e a homogeneidade de variância, estes foram submetidos ao teste “t” de Student para grupos independentes ou à análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, conforme necessário. Quando reexposições ao mesmo contexto foram analisadas, adotamos a ANOVA de medidas repetidas. Após as análises de variância, o teste *post-hoc* de Newman-Keuls foi aplicado, adotando-se um valor de significância estatística $P < 0,05$. Todos os dados obtidos foram analisados com o software Statistica® 13.1 (Dell, StatSoft Inc., EUA) e representados graficamente através do GraphPad Prism® 5 (GraphPad Prism, EUA).

4.8 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Para encontrar artigos que envolvam a evolução, anatomia e fisiologia comparada do CPFvm, será realizada uma busca no banco de dados do PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Na busca, serão incluídos artigos que: incluam análises evolutivas e/ou filogenéticas, modulações ou registro das atividades no IL de roedores ou no CPFvm de humanos e outros mamíferos, ou tratem da evolução do neocórtex de mamíferos e do córtex de outras classes de vertebrados.

5. RESULTADOS

5.1 Efeito da inativação temporária do córtex infralímbico (IL) durante a aquisição de memórias contextuais aversivas sobre a expressão de congelamento nos testes A e B

No primeiro experimento, avaliamos o papel do córtex infralímbico (IL) na aquisição de memórias de contextuais aversivas. Para tal, 17 animais foram alocados em 2 grupos (n= 8-9 por grupo) de acordo com o tratamento feito (VEI ou MUS). A microinjeção de MUS diretamente no IL foi realizada 20 minutos antes da sessão de condicionamento aversivo ao contexto (CAC), para que a droga atingisse seu pico de efeito durante a sessão. Nos dias subsequentes ao condicionamento, os animais passaram então pelos testes A e B.

Conforme mostrado na figura 11, não houve diferenças significativas no teste A ($t_{15}= 0,43$; $P= 0,67$), enquanto que no teste B os grupos apresentaram tempos médios de congelamento significativamente diferentes ($t_{15}= 2,51$; $P= 0,02$). A inativação do IL durante a aquisição do condicionamento foi capaz de gerar aumento de respostas generalizadas sem influenciar as respostas ao contexto pareado, sugerindo que a atividade do IL durante a aquisição de memórias de contextuais aversivas é necessária para manter a especificidade destas.

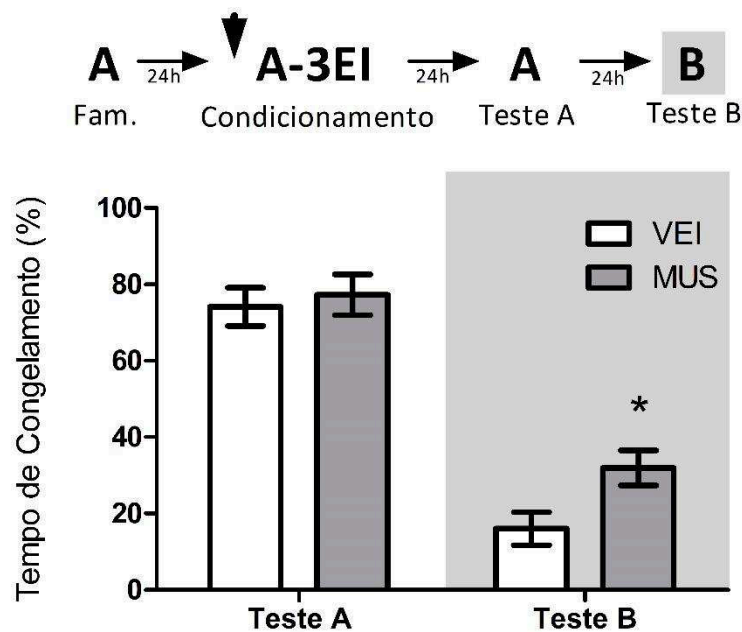


Figura 11: A inativação temporária do córtex infralímbico (IL) durante a aquisição de memórias contextuais aversivas aumenta a expressão de congelamento perante o contexto não pareado. Veículo (VEI)

ou Muscimol (MUS) foram injetados diretamente no IL 20 minutos antes da sessão de condicionamento aversivo ao contexto. A seta vertical indica o momento da injeção. Os valores estão expressos como média \pm EPM do tempo de congelamento perante o contexto pareado (teste A) 1 dia após o condicionamento e perante o contexto não pareado (teste B), 2 dias após (VEI $n=9$; MUS $n=8$). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle naquele teste (Teste “t” de Student para grupos independentes).

5.2 Efeito da inativação temporária do córtex infralímbico após o condicionamento aversivo ao contexto sobre a expressão de congelamento nos testes A e B

Neste experimento, buscamos verificar se a atividade do IL após o condicionamento pode influenciar a consolidação de memórias de contextuais aversivas. Para tanto, 14 animais foram divididos em 2 grupos ($n=7$ por grupo), de acordo com o tratamento. Todos os animais passaram pelo CAC, e imediatamente após, receberam tratamento de MUS ou VEI diretamente no IL, buscando inativar a região no período de consolidação das memórias.

Utilizando o teste “t” de Student, verificamos que não houve diferenças significativas nos níveis de congelamento entre os grupos no teste A ($t_{12}=0,27$; $P=0,79$). Entretanto, no teste B houve diferenças significativas entre os grupos ($t_{12}=3,19$; $P=0,008$). Esses resultados sugerem que a atividade no IL durante a consolidação também é importante para a manutenção da especificidade de memórias de contextuais aversivas recém-formadas.

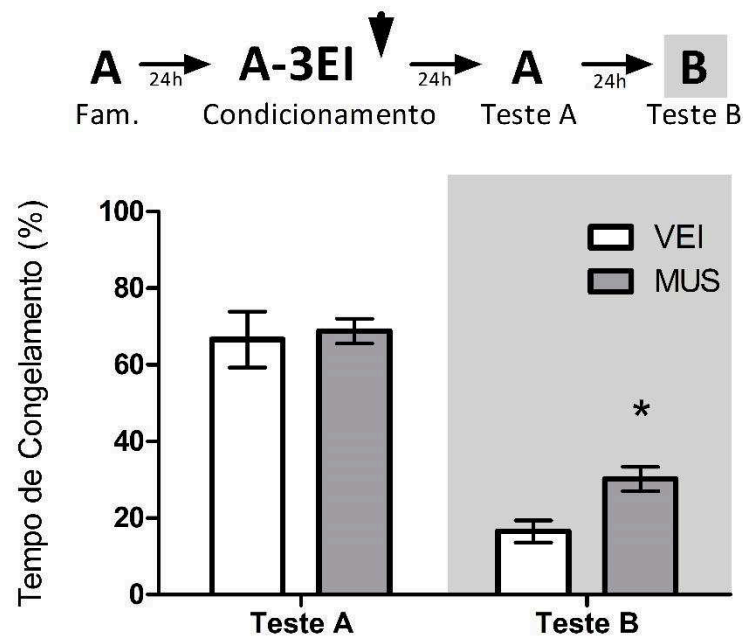


Figura 12: A inativação temporária do córtex infralímbico (IL) imediatamente após o condicionamento aversivo ao contexto (CAC) aumenta a expressão de congelamento perante o contexto não pareado. Veículo (VEI) ou Muscimol (MUS; 4nmol) foram injetados diretamente no IL imediatamente após sessão de CAC. A seta vertical indica o momento da injeção. Os valores estão expressos como média \pm EPM do tempo de congelamento

perante o contexto pareado (teste A) 1 dia após o condicionamento e perante o contexto não pareado (teste B), 2 dias após (VEI $n=7$; MUS $n=7$). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle naquele teste (Teste “t” de Student para grupos independentes).

5.3 Efeito da inativação temporária do córtex infralímbico 6 h após o condicionamento aversivo ao contexto sobre a expressão de congelamento nos testes A e B

Para investigar se o efeito observado nos experimentos anteriores era de fato devido a fatores associativos, e não a uma sensibilização gerada pela manipulação farmacológica, conduzimos o presente experimento, onde decidimos infundir MUS apenas 6 h após o condicionamento. A janela de 6 h foi escolhida, pois após este intervalo as memórias normalmente não são susceptíveis a intervenções experimentais, devido a já terem sido consolidadas (Dudai et al., 2004; Gazarini et al., 2015; Troyner et al., 2018).

Para tanto, 14 animais foram divididos em 2 grupos ($n=7$ por grupo) de acordo com o tratamento recebido no IL 6 h após o condicionamento (VEI ou MUS). Nos dias seguintes, os animais passaram pelos testes A e B normalmente. Analisando os testes A e B, o teste “t” de Student mostrou que não há diferenças significativas nos níveis de congelamento dos grupos no teste A ($t_{12}=0,12$; $P=0,91$), e que utilizando o intervalo de 6 h entre condicionamento e tratamento, os efeitos observados anteriormente no teste B desaparecem ($t_{12}=0,13$; $P=0,90$). Com este experimento pode-se concluir que os efeitos observados no experimento anterior dependem da janela temporal entre o condicionamento e o tratamento, e que a infusão de MUS no IL *per se* não foi capaz de alterar as respostas nos testes A e B.

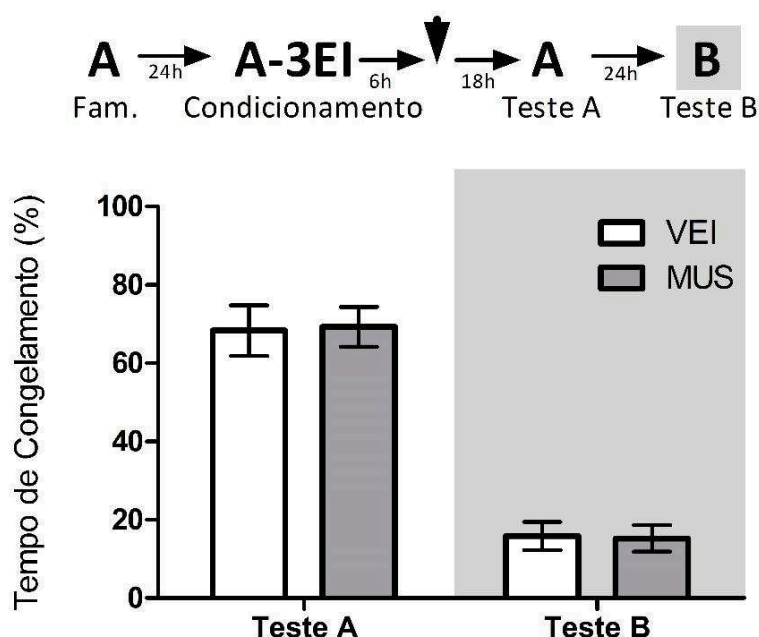


Figura 13: A inativação temporária do córtex infralímbico (IL) 6 h após o condicionamento aversivo ao contexto (CAC) não é capaz de interferir com as respostas nos testes A e B. Veículo (VEI) ou Muscimol (MUS; 4nmol) foram injetados diretamente no IL 6 h após sessão de CAC. A seta vertical indica o momento da injeção. Os valores estão expressos como média \pm EPM do tempo de congelamento perante o contexto pareado (teste A) 1 dia após o condicionamento e perante o contexto não pareado (teste B), 2 dias após (VEI $n=7$; MUS $n=7$).

5.4 Efeito da inativação temporária do córtex infralímbico após o treino moderado sobre a expressão de congelamento nos testes A e B

Para investigar se o efeito do tratamento apenas no teste B nos experimentos 1 e 2 está associado com uma diminuição na especificidade da memória em função de um aumento na sua intensidade (memórias mais intensas tendem a ser mais generalizadas), realizou-se um experimento utilizando uma intensidade de condicionamento menos intenso (um pareamento ao invés de três). No experimento, foram utilizados 14 animais, divididos em 2 grupos ($n=7$ por grupo) de acordo com o tratamento (VEI ou MUS). Imediatamente após o condicionamento utilizando apenas um choque nas patas (caracterizando treino moderado), os animais receberam os tratamentos.

No teste A, assim como nos experimentos anteriores, o teste “t” não demonstrou diferenças significativas entre os grupos no teste A ($t_{12}=0,47$; $P=0,64$), mas novamente foram observadas diferenças significativas no teste B ($t_{12}=2,23$; $P=0,04$). Os resultados deste

experimento indicam que a atividade do IL durante a consolidação de fato não interfere com a expressão de congelamento no contexto A, já que o grupo tratado com MUS apresenta diferenças nos níveis de congelamento apenas no teste B.

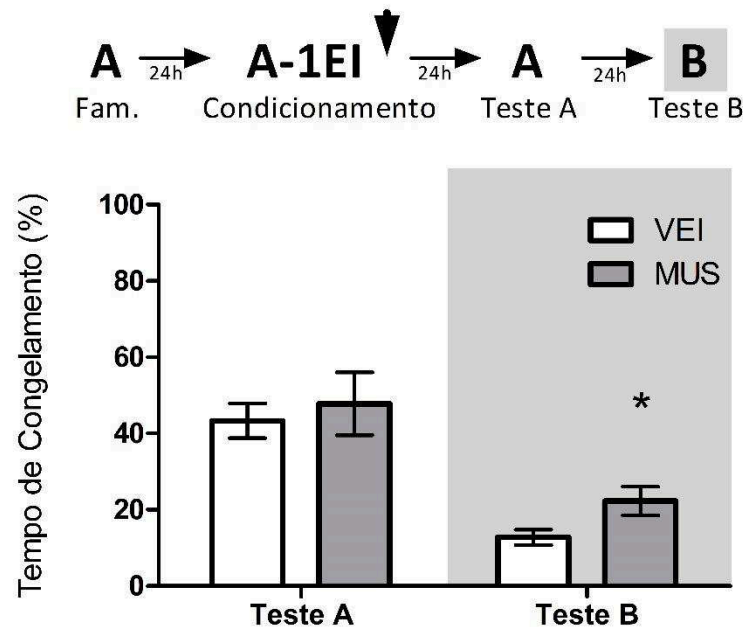


Figura 14: A inativação temporária do córtex infralímbico (IL) após treino moderado aumenta a expressão de congelamento perante o contexto não pareado. Veículo (VEI) ou Muscimol (MUS; 4nmol) foram injetados diretamente no IL imediatamente após sessão de condicionamento aversivo ao contexto utilizando o treino moderado. A seta vertical indica o momento da injeção. Os valores estão expressos como média \pm EPM do tempo de congelamento perante o contexto pareado (teste A) 1 dia após o condicionamento e perante o contexto não pareado (teste B), 2 dias após (VEI n= 7; MUS n=7). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle naquele teste (Teste “t” de Student para grupos independentes).

5.5 Efeito da inativação temporária do córtex infralímbico (IL) após o condicionamento sobre a extinção de memórias contextuais aversivas

Para verificar se a atividade no IL durante a consolidação pode interferir com uma extinção subsequente, 15 animais foram divididos em 2 grupos (7-8 por grupo) de acordo com o tratamento recebido no IL (VEI ou MUS). Neste experimento, após os primeiros testes A e B (testes A1 e B1), os animais passaram por uma sessão de extinção de 20 minutos, e 7 dias depois do teste A1, os animais foram expostos novamente ao contexto A para avaliar a retenção da memória de extinção, no teste A2, e no dia seguinte, aconteceu a segunda exposição ao contexto não pareado, caracterizando o teste B2.

Confirmando os dados obtidos nos experimentos iniciais, novamente não houve diferenças significativas no teste A1 ($t_{13}= 0,64$; $P= 0,53$), enquanto que no teste B1, o grupo MUS apresentou níveis significativamente maiores de congelamento ($t_{13}= 4,21$; $P= 0,001$). Analisando a sessão de extinção, uma ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito do tratamento ($F_{1,13}= 6,90$; $P= 0,02$) e dos blocos da sessão de extinção ($F_{9,117}= 3,49$; $P= 0,00075$), entretanto, não houve interação entre estes fatores ($F_{9,117}= 0,65$; $P= 0,75$) (Figura 15). Ao comparar os testes A1 e A2, para verificar a retenção da memória de extinção, a ANOVA de medidas repetidas demonstrou efeito significativo do tratamento ($F_{1,13}=9,05$; $P= 0,01$), do dia em que o teste foi realizado (antes ou após a sessão de extinção) ($F_{1,13}=80,74$; $P=0,00000$), e da interação entre os dois fatores ($F_{1,13}=18,02$; $P= 0,001$). No teste *post-hoc* de Newman-Keuls, verificou-se que ambos os grupos não apresentam diferenças significativas no teste A1, são diferentes entre si quando comparamos seus níveis de congelamento no teste A2 com aqueles do teste A1, e são diferentes entre si no teste A2. Quando realizamos a ANOVA de medidas repetidas para comparar os testes B1 e B2 houve efeito apenas para o tratamento ($F_{1,13}= 18,088$; $P= 0,001$), sem efeito para dia do teste ou interação entre os dois fatores. O *post-hoc* de Newman-Keuls mostra que não há diferença entre um mesmo grupo quando se compara os testes B1 e B2, mas que em ambos os testes o grupo MUS apresentou nível significativamente superior de tempo de congelamento, indicando ausência de efeito da extinção sobre as respostas perante o contexto B.

Além disso, pode-se inferir que uma a atividade íntegra do IL durante o período de consolidação de uma memória contextual aversiva foi requerida para que essa memória seja susceptível a uma extinção posterior, já que o grupo tratado com MUS apresentou um índice de redução no nível de congelamento menor que o do grupo controle – o grupo MUS apresentou uma redução média de 21%, enquanto o grupo VEI apresentou redução média de mais de 60% entre o teste A1 e o teste A2 ($P= 0,0001$). Além disso, pode-se concluir que a sessão de extinção não tem efeito sobre o aumento de respostas generalizadas induzidas pela inativação do IL.

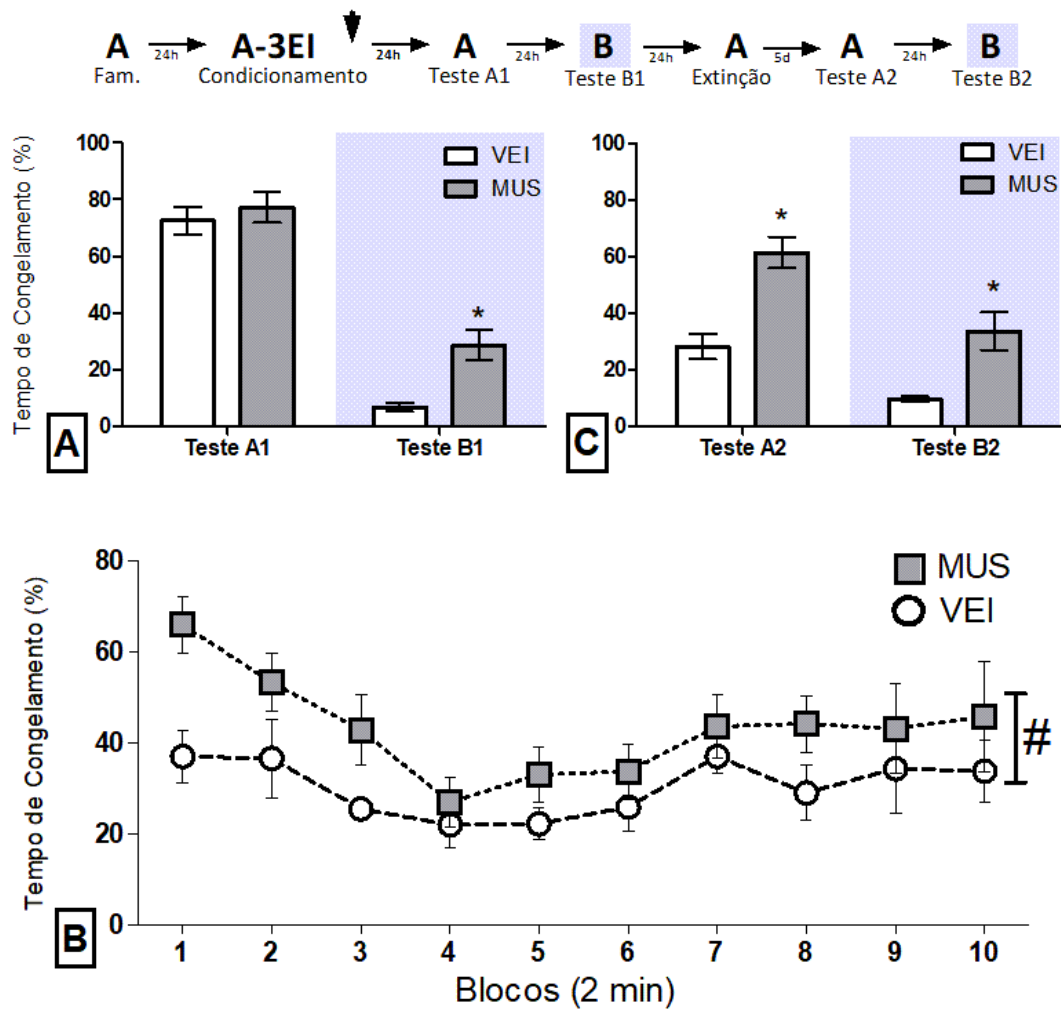


Figura 15: A inativação temporária do córtex infralímbico (IL) após a sessão de condicionamento aversivo ao contexto (CAC) afeta a extinção subsequente. Veículo (VEI) ou Muscimol (MUS; 4nmol) foram injetados diretamente no IL imediatamente após a sessão de CAC. A seta vertical indica o momento da injeção. Os valores estão expressos como média \pm EPM do tempo de congelamento. **A)** níveis médios de congelamento dos dois grupos nos testes A1 e B1. **B)** 24h após o teste B1 os animais passaram por uma sessão de extinção que durava 20 minutos e está representada como 10 blocos de 2 minutos. # indica efeito do tratamento e da sessão de extinção sobre os níveis de congelamento. **C)** 5d após a sessão de extinção, os animais retornam ao contexto pareado no teste A2, e então passam pelo teste B2. (VEI n= 8; MUS n=7). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle no mesmo teste (Teste “t” de Student para grupos independentes).

6. DISCUSSÃO

Os resultados experimentais obtidos sugerem que o córtex infralímbico (IL) participa ativamente da modulação de atributos, tal como a especificidade, de uma memória contextual aversiva durante sua aquisição e consolidação, já que quando ele foi inativado observamos aumento na expressão generalizada de respostas defensivas e maior resistência à sessão de extinção. Entretanto, a atividade do IL não parece ser crucial para a consolidação destas memórias, já que quando inativado durante a aquisição e após o condicionamento, não impede a expressão de congelamento no contexto pareado, assim, o IL parece ser uma região que é capaz de modular a consolidação, mas que não é indispensável para que ela ocorra.

6.1 AQUISIÇÃO E CONSOLIDAÇÃO

A inativação do IL durante a aquisição e consolidação de memórias contextuais aversivas gerou aumento na expressão de congelamento no contexto não pareado, demonstrando um efeito do IL durante a aquisição na modulação da especificidade mnemônica. Sabe-se que o córtex pré-frontal medial (CPFm) está envolvido na circuitaria recrutada durante o condicionamento aversivo ao contexto (CAC) e na regulação de respostas defensivas (Nieuwenhuis & Takashima, 2010; Rozeske et al, 2014; Giustino & Maren, 2015), entretanto, o papel do IL na aquisição e consolidação de memórias aversivas é pouco explorado, e normalmente os estudos concluem que o IL não seria importante no processamento inicial destas memórias, sendo recrutado apenas no momento da extinção ou para um aprendizado alternativo ao inicial (Nieuwenhuis & Takashima, 2010; Sierra-Mercado et al., 2011; Do-Monte et al., 2015; Mukherjee & Caroni, 2018). Contudo, sabe-se que outras regiões do CPFm estão associadas com a aquisição e consolidação de memórias aversivas (Rozeske et al. 2015; Vanvossen et al., 2017), e sabe-se também, que a circuitaria interna do CPFm modula a resposta da região como um todo, e que o IL é de grande importância neste circuito pois envia projeções tanto para o PL quanto para o córtex cingulado anterior (ACC) (Vertes, 2004). Além da influência sobre regiões corticais, a ativação que o IL exerce sobre as células intercalares de amígdala (ITC) também deve estar associada aos efeitos comportamentais da inativação do IL, já que as ITC são interneurônios GABAérgicos que reduzem a atividade da amígdala central, que é responsável por induzir respostas defensivas (Royer & Paré, 2002; Amir et al., 2011).

Assim, faz sentido que a atividade do IL possa modular pelo menos algumas características da formação e consolidação de memórias aversivas, e, de fato, há evidências indiretas para envolvimento do IL na consolidação num estudo que demonstrou que irradiação gama foi capaz de aumentar a expressão de respostas defensivas no contexto pareado e a única região cerebral que apresentou diferenças na expressão de c-Fos, entre as avaliadas, foi o IL (Kugelman et al., 2016). Também há um estudo demonstrando que doses excitotóxicas de NMDA no CPFm não alteram as respostas condicionadas, mas levam ao aumento da generalização das respostas defensivas (Antoniadis & McDonald, 2006), achado muito semelhante ao experimento 1 do presente estudo. Porém, o estudo de Antoniadis & McDonald utiliza lesões que incluem tanto o IL quanto as outras regiões do CPFm (PL e CCA), dificultando uma comparação mais aprofundada entre estudos.

A ausência de efeito no experimento onde foram realizadas infusões de MUS apenas 6 h após o condicionamento pode ser explicada pela janela temporal da consolidação da memória, já que em diversos estudos, tratamentos realizados depois das primeiras horas após o treino não geram mais efeito (Gazarini et al., 2015; Troyner et al., 2018). Além disso, este experimento indica que o maior nível de congelamento observado nos experimentos anteriores não está associado a uma sensibilização induzida pelo tratamento, ou seja, a inativação do IL interfere especificamente com o processamento mnemônico e a infusão de MUS *per se* não leva a um aumento na expressão de congelamento nos testes A e B.

No experimento 4, utilizamos um número de pareamentos menor para que o nível de congelamento dos animais durante a re-exposição ao contexto pareado não atingisse valores próximos ao do teto. Se a ausência de efeito no teste A fosse de fato devido à presença de um efeito teto, um treino menos intenso poderia então permitir a visualização destes efeitos. Estudos prévios de nosso laboratório já encontraram tal efeito, e conseguiram evidenciá-lo a partir da utilização de um treino mais fraco (Vanvossen et al., 2017; Troyner et al., 2018). Em nosso caso, o experimento envolvendo treino moderado confirmou os achados dos experimentos anteriores, onde há efeito do tratamento apenas no congelamento do teste B, sem diferenças significativas no teste A. Estes dados suportam a ideia de que o IL seria importante na modulação do grau de generalização da expressão de congelamento.

6.2 EXTINÇÃO

Sabe-se também que o IL é peça-chave no processamento de memórias de extinção, sendo que ele é necessário tanto para a aquisição (Milad & Quirk, 2002) quanto para a consolidação da extinção (Laurent & Westbrook, 2009; Do-Monte et al., 2015). Entretanto, não há estudos avaliando a influência da atividade do IL durante a consolidação de memórias contextuais aversivas sobre a sua futura extinção. Recentemente, um estudo demonstrou que a conectividade entre IL e PL durante fases tardias da consolidação (12h após o treino) é necessária para que as memórias formadas sejam susceptíveis a extinção (Mukherjee & Caroni, 2018). Entretanto, no estudo foi usado o condicionamento ao traço, que é mais complexo e pode ter sua consolidação com padrões temporais distintos do que ocorre no CAC.

No presente estudo, a inativação do IL após o condicionamento foi capaz de tornar as memórias menos susceptíveis a extinção, além de aumentar as respostas perante o contexto não pareado. No experimento 6, onde o IL foi inativado imediatamente após o treino, observamos primeiramente diferenças significativas apenas no teste B. De maneira interessante, após a sessão de extinção, os grupos passaram a apresentar diferenças significativas também no teste A, evidenciando que a atividade do IL durante a consolidação interfere com o processamento da extinção, já que além do fato das diferenças surgirem apenas no teste A2, a média de redução no grupo VEI foi muito maior do que a redução no grupo MUS (redução média entre A1 e A2= VEI: 60%, MUS 21%). Assim, até o nosso conhecimento, nosso estudo traz a primeira evidência de que a atividade do IL durante a consolidação de memórias contextuais aversivas interfere com sua extinção posterior, já que até então, a única demonstração do papel do IL neste sentido estava vinculada a outros protocolos experimentais (Mukherjee & Caroni, 2018).

A curva de extinção obtida no experimento 6 mostra dados pouco conclusivos, onde a curva de extinção do grupo VEI é diferente da curva do grupo MUS, porém, em nenhum dos grupos, houve diferenças significativas entre os minutos iniciais e finais da sessão. No grupo MUS, há diferenças significativas entre o primeiro bloco e os blocos que correspondem aos minutos 7 ao 12, e no grupo VEI, não há diferença entre o primeiro bloco e qualquer outro.

Em conjunto, essas observações indicam que provavelmente dois fatores impediram a obtenção de resultados mais conclusivos sobre a curva de extinção: primeiramente, a exposição aos testes A1 e B1 foi suficiente para gerar uma redução significativa nos níveis de congelamento nos minutos iniciais da sessão de extinção apenas no grupo VEI. Quando se

compara o primeiro bloco da extinção com o teste A1, o grupo veículo apresenta quedas significativas (média de congelamento no A1= 76,87% x média de congelamento nos primeiros blocos da extinção= 36,98%. $P= 0,0002$), enquanto o grupo muscimol foi pouco afetado pelos testes A1 e B1 (média de congelamento no A1= 79,52% x média de congelamento nos primeiros blocos da extinção= 65,95%. $P= 0,07$). Essa análise sugere que os animais do grupo VEI apresentaram uma extinção de respostas devido aos testes que precederam a sessão de extinção em si, e com isso, a observação de diferenças durante a sessão foi dificultada. Assim, seria interessante repetir o experimento sem a realização dos testes A1 e B1 antes da sessão de extinção, para que se possa observar com mais facilidade a influência da inativação do IL durante a consolidação sobre a extinção, sem que haja outros fatores interferentes, como foram neste experimento os testes anteriores à extinção.

Um segundo fator que dificultou a análise dos dados obtidos na curva de extinção foi, possivelmente, a duração excessiva da sessão. Pode-se observar na curva do grupo MUS, que o primeiro bloco somente difere dos blocos correspondentes ao período que vai de 6 a 12 minutos desde o início da sessão, e nos blocos seguintes a diferença desaparece, sugerindo que uma extinção de menor duração já seria suficiente para gerar redução nos níveis de congelamento, e ainda que uma sessão tão longa como a utilizada possa dificultar a observação de diferenças entre os minutos iniciais e finais da sessão, já que os animais passaram a aumentar seus níveis de congelamento após a queda observada até o minuto 12.

Apesar dos problemas observados com a curva obtida a partir da sessão de extinção, as diferenças no padrão de resposta quando compara-se os testes A1 e B1 mostra que sem dúvidas a sessão foi capaz de extinguir as respostas dos animais tratados com VEI, enquanto que seu efeito sobre os animais do grupo MUS foram bem menos intensas. Assim, a aparente inconsistência perante a curva de extinção não é tão grave, já que é quando se estuda extinção, normalmente é a retenção da memória de extinção que indica o sucesso da sessão de extinção, e não as diferenças intra-sessão (Myers & Davis, 2007). Ainda neste sentido, diferentes estudos mostram que as interferências que impedem ou facilitam a extinção, muitas vezes não geram efeito na sessão de extinção em si, mostrando que a extinção de respostas defensivas pode muitas vezes ser independentes dos níveis de congelamento durante a sessão de extinção (Hong & Kim, 2017; Do-Monte et al., 2015).

Tendo em mente essas considerações, há ao menos duas explicações para o padrão de extinção observado nos animais que tiveram o IL inativado: primeiramente, isso pode ser

devido à formação de memórias mais robustas e menos susceptíveis a extinção quando inativa-se o IL durante a consolidação. Entretanto, essa possibilidade não é suportada pelos dados, já que em nenhum experimento foi observado aumento nas respostas perante o contexto pareado, indicando que com a inativação do IL as memórias se tornaram apenas mais generalizadas. Como alternativa, pode-se considerar que a atividade do IL durante a consolidação sinaliza de algum modo, que a memória recém formada será susceptível a extinção no futuro. Pode ser a marcação de células específicas do IL após o condicionamento que permita que, durante a sessão de extinção, o IL seja hiperativado e a memória possa ser extinta com sucesso, algo que vai de encontro a resultados encontrados no estudo de Mukherjee & Caroni (2018).

6.3 A INFLUÊNCIA DO CÓRTEX INFRALÍMBICO NO PROCESSAMENTO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS

Sabe-se que o IL regula diversos processos emocionais, cognitivos e autonômicos. No que diz respeito à regulação autonômica, há evidências de que o IL está envolvido no processamento da dor (David-Pereira et al., 2016; Yue et al., 2017), de mudanças na pressão arterial relacionadas ao estresse (Fisk & Wiss, 2000; Müller-Ribeiro et al., 2012), e além disso regula a secreção de corticosterona através da modulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (Ronzoni et al., 2016). Quanto a sua influência sobre processos emocionais e cognitivos, é interessante notar que o IL está associado ao controle de comportamentos de tipo depressivo (Reese et al., 2013), de maneira que os estudos sugerem que a integridade funcional dessa região é requerida para regulação desse tipo de comportamento. O IL também está relacionado com tomada de decisão e flexibilidade comportamental (Ragozzino et al., 1999; Zeeb et al., 2015), de modo interessante, nessas tarefas o IL parece atuar de maneira conjunta com o PL, e não oposta, como na maioria das tarefas comportamentais. Sabe-se ainda que o IL seria uma área crucial no controle inibitório da impulsividade e da aquisição de hábitos, como ocorre na adição (Peters et al., 2009; Barker et al., 2014; Tsutsui-Kimura et al., 2016), onde o IL parece agir como um “freio” perante comportamentos impulsivos e consumo de drogas de abuso como cocaína (Peters et al., 2009).). Embora esteja bom, isso poderia estar na introdução --- Penso que na introdução os pontos principais seriam mostrar mais especificamente o que se sabe da influência do IL sobre memórias de medo, assim, entendo que esses dados entram mais como

um suporte para a conclusão de que o IL teria esse mesmo padrão de controle inibitório em outros tipos de comportamentos Ok

No processamento de memórias aversivas, é sugerido que o IL tenha papel ativo no aprendizado de memórias de extinção, já que apresenta-se hiperativado durante a sessão de extinção (Milad & Quirk, 2002), e quando inibido, impede o aprendizado da extinção (Sierra-Mercado et al., 2011; Do-Monte et al., 2015). Por outro lado, poucos estudos associam a atividade do IL com o processamento inicial de memórias aversivas, o que leva a uma noção de que o IL somente é recrutado quando há necessidade de extinguir memórias. Entretanto, existem poucos artigos avaliando a influência que a atividade do IL durante a consolidação/aquisição de memórias contextuais aversivas sobre a expressão generalizada de respostas defensivas, como feito neste trabalho. Os únicos estudos que evidenciam algo semelhante, para nosso conhecimento, são: o de Antoniadis & McDonald (2006), porém, como já citado anteriormente, o estudo utilizou um método de lesão que abrange além do IL, outras áreas do CPFm; Zelikowsky et al. (2013), que demonstra o papel supressor de respostas generalizadas que o IL possui, também através de lesão; e também há o estudo de Ashwell & Ito (2014), que relatou um papel do IL na discriminação contextual no condicionamento contextual apetitivo. Assim, o presente estudo seria o primeiro a evidenciar, através de intervenções transitórias, que o IL é necessário durante a formação nas memórias para que elas sejam específicas e susceptíveis a extinção.

Assim, o IL seria uma peça importante na regulação da formação de memórias aversivas. Isso provavelmente se deve a seu padrão distinto de conectividade dentro do CPFm, já que é sabido que o IL estimula as células intercalares da amígdala, que são interneurônios GABAérgicos conectados a amígdala central, e portanto, ao estimular o IL, há uma redução na atividade da amígdala central, o que está correlacionado a menor expressão de respostas defensivas (Sierra-Mercado et al., 2011; Do-Monte et al., 2015). Além disso, o mesmo circuito parece estar envolvido na generalização de memórias aversivas (Lopresto et al., 2016), o que pode explicar os resultados obtidos onde a inativação do IL durante a consolidação gerou aumento na generalização. Entretanto, nosso estudo usou apenas medidas comportamentais, e para investigar os mecanismos envolvidos nos resultados encontrados ao inativar o IL, e sobre como esta inativação influencia outras regiões cerebrais, é necessário realizar experimentos capazes de revelar como a infusão de MUS no IL influenciou a atividade neuronal em outras regiões, por exemplo, por meio de alguma técnica imunoistoquímica.

6.4 A EVOLUÇÃO DO CÓRTEX INFRALÍMBICO E SEU HOMÓLOGO NOS HUMANOS

Quando se compara o IL de ratos com o CPFvm de humanos, estas regiões parecem ter papéis muito similares, já que o CPFvm também é relacionado com a extinção de memórias (Phelps et al., 2004; Milad et al., 2005), impulsividade (Boes et al., 2009), controle sobre o uso de drogas (Konova et al., 2017) e regulação autonômica (Hänsel & Känel, 2008). O CPFvm também está hipoativo em pacientes com TEPT (Etkin & Wager, 2007; Koenings & Grafman, 2009) e volume reduzido em pacientes depressivos e bipolares (Drevets et al., 2008). Desse modo, faz sentido acreditar que ambas as regiões sejam homólogas, entretanto, como também exposto na seção 4.7 deste estudo, o CPFvm é uma região complexa e consiste em diversas sub-regiões, de maneira que o IL parece ser melhor considerado como o homólogo da área 25 de Brodmann, região constituinte do CPFvm (Öngür et al., 2003; Hiser & Koenings, 2018), e não do CPFvm como um todo. Além disto, estudos translacionais devem atentar-se ao fato de que as relações de homologia entre áreas corticais normalmente são excessivamente complexas para que as implicações de estudos em roedores sejam prontamente consideradas para as regiões homólogas em humanos.

O IL (e seu homólogo humano) parece ter surgido durante a evolução de mamíferos basais, num momento no qual estes estavam sujeitos a uma enorme pressão evolutiva quanto à necessidade de se adequar rapidamente ao meio-ambiente em constante mutação, de detectar rapidamente as fontes de recurso, e o mais importante: a necessidade de se manter vivo. Apesar de que hoje o humano não possui nenhum predador, nem sempre foi assim. A necessidade de se proteger de outros animais, eventuais predadores, sempre foi uma grande pressão seletiva, guiando o desenvolvimento filogenético e ontogenético do cérebro de mamíferos (Jerison, 1973; Shultz & Finlayson, 2010).

Nesse sentido, o IL foi uma das diversas regiões neocorticais de mamíferos que se especializaram e permitiram o controle de comportamentos indesejados neste panorama evolutivo. Por um lado, os animais necessitam aprender a evitar seus predadores, e ao formar memórias aversivas referentes a eles, acabam por generalizar o aprendizado para outras situações, o que é altamente adaptativo, já que em situações de perigo, quando há incerteza entre a similaridade entre o aprendido e o observado, mais vale errar com um falso positivo

(Ghirlanda & Enquist, 2003). Por outro lado, quando o aprendizado referente à situação aversiva passa a ser evocado por pistas muito diferentes das condicionadas, os animais tendem a diminuir demasiadamente seu forrageamento (busca por recursos), de forma maladaptativa (Ghirlanda & Enquist, 2003; Addicot et al., 2017). Assim, é necessário um ajuste fino no que diz respeito à flexibilidade comportamental e ao controle da especificidade de memórias aversivas para manter os comportamentos dentro do que é adaptativa e evolutivamente estável, sendo que o IL parece ser um módulo cortical que surge para se integrar a uma circuitaria envolvida neste tipo de tarefa e controlar sua atividade de “cima para baixo”.

Em suma, os resultados e conclusões obtidas apontam que o papel do IL é de atuar como uma espécie de freio no que diz respeito comportamentos impulsivos, respostas aversivas inapropriadas e consumo abusivo de drogas, além de atuar como um promotor de atualizações mnemônicas, sejam as memórias aversivas ou apetitivas. Este papel do IL reflete a sua conectividade com diversas estruturas subcorticais como amígdala, hipocampo ventral, núcleo reuniens, núcleo accumbens, matéria cinzenta periaquedutal, já que estas são regiões que controlam a execução dos comportamentos citados anteriormente.

Em conjunto com o conteúdo abordados na seção 1.4 deste trabalho, alguns pontos ficam evidentes:

- O CPF não apresenta homólogos claros fora de mamíferos, apesar de possuir um análogo (NCP) em aves;
- O CPF de humanos apresenta, em algumas subregiões, características celulares e funcionais não encontrados em outros animais da mesma forma, apesar de haver uma homologia clara para o CPF como um todo em mamíferos (aférentes vindos do tálamo mediodorsal);
- O CPF_{vm} de humanos apresenta correlatos em roedores com padrões similares de conectividade e funcionalidade com seus correlatos em roedores;
- Visto que no humano o CPF_{vm} apresenta-se, de maneira geral como um supressor de respostas defensivas, o IL de roedores parece ser o análogo (funcionalmente semelhante, mas não homólogo) desta área em roedores;

- O IL de roedores não parece ser o homólogo do CPFvm como um todo, e sim de a área 25, que está situada nele, já que ambos tem papel crucial na extinção e apresentam um padrão de conectividade com a amígdala muito similar;

7. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados experimentais do presente estudo apontam para uma participação do córtex infralímbico (IL) na regulação da especificidade durante a aquisição e consolidação de memórias contextuais aversivas. A atividade no IL durante a consolidação também parece ser essencial para que as memórias possam ser suficientemente susceptíveis a extinção posteriormente. Além disto, o conjunto de resultados sugere que o controle exercido pelo IL não variaria com a intensidade da memória.

O levantamento sobre a evolução e anatomia comparada do córtex com ênfase no IL de roedores e córtex pré-frontal ventromedial (CPFvm) de humanos foi importante para o desenvolvimento da discussão e introdução do trabalho. Isso porque normalmente os estudos dão pouca importância para a verificaçãods das relações de homologia e com isso há divergências e controvérsias na literatura a respeito do correspondente, no humano, do IL. Mas tendo sido realizado esta pesquisa, e levando em conta os estudos mais aprofundados quanto à anatomia comparada, o IL parece ter seu correspondente na área 25 de Brodmann, parte do CPFvm.

8. REFERÊNCIAS

- Abbott, L., & Nelson, S. (2000). Synaptic plasticity: taming the beast. *Nature Neuroscience*, 3(Supp), 1178-1183. doi: 10.1038/81453
- Aboitiz, F., Montiel, J., & López, J. (2002). Critical steps in the early evolution of the isocortex: Insights from developmental biology. *Brazilian Journal Of Medical And Biological Research*, 35(12), 1455-1472. doi: 10.1590/s0100-879x2002001200006
- Aboitiz, F., Morales, D., & Montiel, J. (2003). The evolutionary origin of the mammalian isocortex: Towards an integrated developmental and functional approach. *Behavioral And Brain Sciences*, 26(05). doi: 10.1017/s0140525x03000128
- Addicott, M., Pearson, J., Sweitzer, M., Barack, D., & Platt, M. (2017). A Primer on Foraging and the Explore/Exploit Trade-Off for Psychiatry Research. *Neuropsychopharmacology*, 42(10), 1931-1939. doi: 10.1038/npp.2017.108
- Amir, A., Amano, T., & Pare, D. (2011). Physiological identification and infralimbic responsiveness of rat intercalated amygdala neurons. *Journal Of Neurophysiology*, 105(6), 3054-3066. doi: 10.1152/jn.00136.2011
- Antoniadis, E., & McDonald, R. (2006). Fornix, medial prefrontal cortex, nucleus accumbens, and mediodorsal thalamic nucleus: Roles in a fear-based context discrimination task. *Neurobiology Of Learning And Memory*, 85(1), 71-85. doi: 10.1016/j.nlm.2005.08.011
- Ashwell, R., & Ito, R. (2014). Excitotoxic lesions of the infralimbic, but not prelimbic cortex facilitate reversal of appetitive discriminative context conditioning: the role of the infralimbic cortex in context generalization. *Frontiers In Behavioral Neuroscience*, 8. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00063
- Barker, J., Taylor, J., & Chandler, L. (2014). A unifying model of the role of the infralimbic cortex in extinction and habits. *Learning & Memory*, 21(9), 441-448. doi: 10.1101/lm.035501.114
- Berkers, R., Klumpers, F., & Fernández, G. (2016). Medial prefrontal–hippocampal connectivity during emotional memory encoding predicts individual differences in the loss of associative memory specificity. *Neurobiology Of Learning And Memory*, 134, 44-54. doi: 10.1016/j.nlm.2016.01.016
- Bicks, L., Koike, H., Akbarian, S., & Morishita, H. (2015). Prefrontal Cortex and Social Cognition in Mouse and Man. *Frontiers In Psychology*, 6. doi: 10.3389/fpsyg.2015.01805
- Blanchard Rj., Blanchard Dc. 1969. Crouching as an index of fear. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 67, 370–375. doi: 10.1037/h0026779

- Bliss, T., & Lømo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal Of Physiology*, 232(2), 331-356. doi: 10.1113/jphysiol.1973.sp010273
- Boes, A., Bechara, A., Tranel, D., Anderson, S., Richman, L., & Nopoulos, P. (2008). Right ventromedial prefrontal cortex: a neuroanatomical correlate of impulse control in boys. *Social Cognitive And Affective Neuroscience*, 4(1), 1-9. doi: 10.1093/scan/nsn035
- Brodmann, K. (1909). *Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues*. Leipzig: Barth.
- Butler, A., Reiner, A., & Karten, H. (2011). Evolution of the amniote pallium and the origins of mammalian neocortex. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 1225(1), 14-27. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06006.x
- Carlén, M. (2017). What constitutes the prefrontal cortex?. *Science*, 358(6362), 478-482. doi: 10.1126/science.aan8868
- Chiba, T., Kayahara, T., & Nakano, K. (2001). Efferent projections of infralimbic and prelimbic areas of the medial prefrontal cortex in the Japanese monkey, *Macaca fuscata*. *Brain Research*, 888(1), 83-101. doi: 10.1016/s0006-8993(00)03013-4
- Connor, S., & Wang, Y. (2015). A Place at the Table. *The Neuroscientist*, 22(4), 359-371. doi: 10.1177/1073858415588498
- Cullen, P., Gilman, T., Winiecki, P., Riccio, D., & Jasnow, A. (2015). Activity of the anterior cingulate cortex and ventral hippocampus underlie increases in contextual fear generalization. *Neurobiology Of Learning And Memory*, 124, 19-27. doi: 10.1016/j.nlm.2015.07.001
- David-Pereira, A., Puga, S., Gonçalves, S., Amorim, D., Silva, C., & Pertovaara, A. et al. (2016). Metabotropic glutamate 5 receptor in the infralimbic cortex contributes to descending pain facilitation in healthy and arthritic animals. *Neuroscience*, 312, 108-119. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.10.060
- Davidson, R., & Richardson, A. (1970). Classical conditioning of skeletal and autonomic responses in the Lizard (*Crotaphytus collaris*). *Physiology & Behavior*, 5(5), 589-594. doi: 10.1016/0031-9384(70)90085-5
- Do-Monte, F., Manzano-Nieves, G., Quinones-Laracuente, K., Ramos-Medina, L., & Quirk, G. (2015). Revisiting the Role of Infralimbic Cortex in Fear Extinction with Optogenetics. *Journal Of Neuroscience*, 35(8), 3607-3615. doi: 10.1523/jneurosci.3137-14.2015

- Drevets, W., Savitz, J., & Trimble, M. (2008). The Subgenual Anterior Cingulate Cortex in Mood Disorders. *CNS Spectrums*, 13(08), 663-681. doi: 10.1017/s1092852900013754
- Dudai, Y. (2004). The Neurobiology of Consolidations, Or, How Stable is the Engram?. *Annual Review Of Psychology*, 55(1), 51-86. doi: 10.1146/annurev.psych.55.090902.142050
- Dudai, Y. (2012). The Restless Engram: Consolidations Never End. *Annual Review Of Neuroscience*, 35(1), 227-247. doi: 10.1146/annurev-neuro-062111-150500
- Dunsmoor, J., & Murphy, G. (2015). Categories, concepts, and conditioning: how humans generalize fear. *Trends In Cognitive Sciences*, 19(2), 73-77. doi: 10.1016/j.tics.2014.12.003
- Edeline, J., Hars, B., Hennevin, E., & Cotillon, N. (2002). Muscimol Diffusion after Intracerebral Microinjections: A Reevaluation Based on Electrophysiological and Autoradiographic Quantifications. *Neurobiology Of Learning And Memory*, 78(1), 100-124. doi: 10.1006/nlme.2001.4035
- Etkin, A., & Wager, T. (2007). Functional Neuroimaging of Anxiety: A Meta-Analysis of Emotional Processing in PTSD, Social Anxiety Disorder, and Specific Phobia. *American Journal Of Psychiatry*, 164(10), 1476-1488. doi: 10.1176/appi.ajp.2007.07030504
- Ferrari, M., Messier, F., & Chivers, D. (2008). Can prey exhibit threat-sensitive generalization of predator recognition? Extending the Predator Recognition Continuum Hypothesis. *Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences*, 275(1644), 1811-1816. doi: 10.1098/rspb.2008.0305
- Ferrier, D., & Yeo, G. (1884). A Record of Experiments on the Effects of Lesion of Different Regions of the Cerebral Hemispheres. *Philosophical Transactions Of The Royal Society Of London*, 175(0), 479-564. doi: 10.1098/rstl.1884.0020
- Fisk, G., & Wyss, J. (2000). Descending projections of infralimbic cortex that mediate stimulation-evoked changes in arterial pressure. *Brain Research*, 859(1), 83-95. doi: 10.1016/s0006-8993(00)01935-1
- Flexner, L., Flexner, J., & Roberts, R. (1967). Memory in Mice Analyzed with Antibiotics. *Science*, 155(3768), 1377-1383. doi: 10.1126/science.155.3768.1377
- Frankland, P., & Bontempi, B. (2005). The organization of recent and remote memories. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(2), 119-130. doi: 10.1038/nrn1607
- Freedman, L., Insel, T., & Smith, Y. (2000). Subcortical projections of area 25 (subgenual cortex) of the macaque monkey. *The Journal Of Comparative Neurology*, 421(2), 172-188. doi: 10.1002/(sici)1096-9861(20000529)421:2<172::aid-cne4>3.0.co;2-8
- Fuster, J. (2008). *The prefrontal cortex*. Amsterdam: Academic Press/Elsevier.

- Galili, D., Ludke, A., Galizia, C., Szyszka, P., & Tanimoto, H. (2011). Olfactory Trace Conditioning in *Drosophila*. *Journal Of Neuroscience*, 31(20), 7240-7248. doi: 10.1523/jneurosci.6667-10.2011
- Gazarini, L., Stern, C., Piornedo, R., Takahashi, R., & Bertoglio, L. (2014). PTSD-Like Memory Generated Through Enhanced Noradrenergic Activity is Mitigated by a Dual Step Pharmacological Intervention Targeting its Reconsolidation. *International Journal Of Neuropsychopharmacology*, 18(1), pyu026-pyu026. doi: 10.1093/ijnp/pyu026
- Ghirlanda, S., & Enquist, M. (2003). A century of generalization. *Animal Behaviour*, 66(1), 15-36. doi: 10.1006/anbe.2003.2174
- Ghiselin, M. (2015). Homology, convergence and parallelism:. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1685), 20150035. doi: 10.1098/rstb.2015.0035
- Ghosh, S., & Chattarji, S. (2014). Neuronal encoding of the switch from specific to generalized fear. *Nature Neuroscience*, 18(1), 112-120. doi: 10.1038/nn.3888
- Giustino, T., & Maren, S. (2015). The Role of the Medial Prefrontal Cortex in the Conditioning and Extinction of Fear. *Frontiers In Behavioral Neuroscience*, 9. doi: 10.3389/fnbeh.2015.00298
- Gottfried, J., O'Doherty, J., & Dolan, R. (2002). Appetitive and Aversive Olfactory Learning in Humans Studied Using Event-Related Functional Magnetic Resonance Imaging. *The Journal Of Neuroscience*, 22(24), 10829-10837. doi: 10.1523/jneurosci.22-24-10829.2002
- Gross, C., & Canteras, N. (2012). The many paths to fear. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(9), 651-658. doi: 10.1038/nrn3301
- Guldin, W., Pritzel, M., & Markowitsch, H. (1981). Prefrontal Cortex of the Mouse Defined as Cortical Projection Area of the Thalamic Mediodorsal Nucleus. *Brain, Behavior And Evolution*, 19(3-4), 93-107. doi: 10.1159/000121636
- Güntürkün, O. (2005). The avian 'prefrontal cortex' and cognition. *Current Opinion In Neurobiology*, 15(6), 686-693. doi: 10.1016/j.conb.2005.10.003
- Güntürkün, O. (2011). The convergent evolution of neural substrates for cognition. *Psychological Research*, 76(2), 212-219. doi: 10.1007/s00426-011-0377-9
- Hänsel, A., & von Känel, R. (2008). The ventro-medial prefrontal cortex: a major link between the autonomic nervous system, regulation of emotion, and stress reactivity?. *Biopsychosocial Medicine*, 2(1). doi: 10.1186/1751-0759-2-21

- Hiser, J., & Koenigs, M. (2018). The Multifaceted Role of the Ventromedial Prefrontal Cortex in Emotion, Decision Making, Social Cognition, and Psychopathology. *Biological Psychiatry*, 83(8), 638-647. doi: 10.1016/j.biopsych.2017.10.030
- Havstad, J., Assis, L., & Rieppel, O. (2015). The semaphorontic view of homology. *Journal Of Experimental Zoology Part B: Molecular And Developmental Evolution*, 324(7), 578-587. doi: 10.1002/jez.b.22634
- Hawkins, R., & Byrne, J. (2015). Associative Learning in Invertebrates. *Cold Spring Harbor Perspectives In Biology*, 7(5), a021709. doi: 10.1101/cshperspect.a021709
- Heidbreder, C., & Groenewegen, H. (2003). The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 27(6), 555-579. doi: 10.1016/j.neubiorev.2003.09.003
- Hong, J., & Kim, D. (2017). Freezing response-independent facilitation of fear extinction memory in the prefrontal cortex. *Scientific Reports*, 7(1). doi: 10.1038/s41598-017-04335-y
- Jackson, J. (1884). The Croonian Lectures on Evolution and Dissolution of the Nervous System. *BMJ*, 1(1213), 591-593. doi: 10.1136/bmj.1.1213.591
- Josselyn, S., Köhler, S., & Frankland, P. (2017). Heroes of the Engram. *The Journal Of Neuroscience*, 37(18), 4647-4657. doi: 10.1523/jneurosci.0056-17.2017
- Karlsson, M., & Frank, L. (2009). Awake replay of remote experiences in the hippocampus. *Nature Neuroscience*, 12(7), 913-918. doi: 10.1038/nn.2344
- Kasties, N., Starosta, S., Güntürkün, O., & Stüttgen, M. (2016). Neurons in the pigeon caudolateral nidopallium differentiate Pavlovian conditioned stimuli but not their associated reward value in a sign-tracking paradigm. *Scientific Reports*, 6(1). doi: 10.1038/srep35469
- Kheirbek, M., Beeler, J., Chi, W., Ishikawa, Y., & Zhuang, X. (2010). A molecular dissociation between cued and contextual appetitive learning. *Learning & Memory*, 17(3), 148-154. doi: 10.1101/lm.1687310
- Koenigs, M., & Grafman, J. (2009). Posttraumatic Stress Disorder: The Role of Medial Prefrontal Cortex and Amygdala. *The Neuroscientist*, 15(5), 540-548. doi: 10.1177/1073858409333072
- Konova, A., Parvaz, M., Bernstein, V., Zilverstand, A., Moeller, S., & Delgado, M. et al. (2017). Neural mechanisms of extinguishing drug and pleasant cue associations in human addiction: role of the VMPFC. *Addiction Biology*. doi: 10.1111/adb.12545

- Kugelman, T., Zuloaga, D., Weber, S., & Raber, J. (2016). Post-training gamma irradiation-enhanced contextual fear memory associated with reduced neuronal activation of the infralimbic cortex. *Behavioural Brain Research*, 298, 1-11. doi: 10.1016/j.bbr.2015.10.050
- Lashley, K. (1933). Integrative functions of the cerebral cortex. *Physiological Reviews*, 13(1), 1-42. doi: 10.1152/physrev.1933.13.1.1
- Laurent, V., & Westbrook, R. (2009). Inactivation of the infralimbic but not the prelimbic cortex impairs consolidation and retrieval of fear extinction. *Learning & Memory*, 16(9), 520-529. doi: 10.1101/lm.1474609
- Lengersdorf, D., Marks, D., Uengoer, M., Stüttgen, M., & Güntürkün, O. (2015). Blocking NMDA-receptors in the pigeon's "prefrontal" caudal nidopallium impairs appetitive extinction learning in a sign-tracking paradigm. *Frontiers In Behavioral Neuroscience*, 9. doi: 10.3389/fnbeh.2015.00085
- Leutgeb, S. (1996). Telencephalic afferents to the caudolateral neostriatum of the pigeon. *Brain Research*, 730(1-2), 173-181. doi: 10.1016/s0006-8993(96)00444-1
- Lissek, S., Kaczurkin, A., Rabin, S., Geraci, M., Pine, D., & Grillon, C. (2014). Generalized Anxiety Disorder Is Associated With Overgeneralization of Classically Conditioned Fear. *Biological Psychiatry*, 75(11), 909-915. doi: 10.1016/j.biopsych.2013.07.025
- Lissek, S., & van Meurs, B. (2015). Learning models of PTSD: Theoretical accounts and psychobiological evidence. *International Journal Of Psychophysiology*, 98(3), 594-605. doi: 10.1016/j.ijpsycho.2014.11.006
- Liu, X., Wan, H., Li, S., Shang, Z., & Shi, L. (2017). The role of nidopallium caudolaterale in the goal-directed behavior of pigeons. *Behavioural Brain Research*, 326, 112-120. doi: 10.1016/j.bbr.2017.02.042
- Longo, N., Milstein, S., & Bitterman, M. (1962). Classical conditioning in the pigeon: Exploratory studies of partial reinforcement. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 55(6), 983-986. doi: <http://dx.doi.org/10.1037/h0049161>
- Lopresto, D., Schipper, P., & Homberg, J. (2016). Neural circuits and mechanisms involved in fear generalization: Implications for the pathophysiology and treatment of posttraumatic stress disorder. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 60, 31-42. doi: 10.1016/j.neubiorev.2015.10.009
- Mackey, S., & Petrides, M. (2014). Architecture and morphology of the human ventromedial prefrontal cortex. *European Journal Of Neuroscience*, 40(5), 2777-2796. doi: 10.1111/ejn.12654

- Maren, S. (2001). Neurobiology of Pavlovian Fear Conditioning. *Annual Review Of Neuroscience*, 24(1), 897-931. doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.897
- Milad, M., & Quirk, G. (2002). Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature*, 420(6911), 70-74. doi: 10.1038/nature01138
- Milad, M., Quinn, B., Pitman, R., Orr, S., Fischl, B., & Rauch, S. (2005). Thickness of ventromedial prefrontal cortex in humans is correlated with extinction memory. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 102(30), 10706-10711. doi: 10.1073/pnas.0502441102
- Milad, M., Wright, C., Orr, S., Pitman, R., Quirk, G., & Rauch, S. (2007). Recall of Fear Extinction in Humans Activates the Ventromedial Prefrontal Cortex and Hippocampus in Concert. *Biological Psychiatry*, 62(5), 446-454. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.10.011
- Myers, K., & Davis, M. (2006). Mechanisms of fear extinction. *Molecular Psychiatry*, 12(2), 120-150. doi: 10.1038/sj.mp.4001939
- Mukherjee, A., & Caroni, P. (2018). Infralimbic cortex is required for learning alternatives to prelimbic promoted associations through reciprocal connectivity. *Nature Communications*, 9(1). doi: 10.1038/s41467-018-05318-x
- Müller-Ribeiro, F., Zaretsky, D., Zaretskaia, M., Santos, R., DiMicco, J., & Fontes, M. (2012). Contribution of infralimbic cortex in the cardiovascular response to acute stress. *American Journal Of Physiology-Regulatory, Integrative And Comparative Physiology*, 303(6), R639-R650. doi: 10.1152/ajpregu.00573.2011
- Myers-Schulz, B., & Koenigs, M. (2011). Functional anatomy of ventromedial prefrontal cortex: implications for mood and anxiety disorders. *Molecular Psychiatry*, 17(2), 132-141. doi: 10.1038/mp.2011.88
- Naumann, R., Ondracek, J., Reiter, S., Shein-Idelson, M., Tosches, M., Yamawaki, T., & Laurent, G. (2015). The reptilian brain. *Current Biology*, 25(8), R317-R321. doi: 10.1016/j.cub.2015.02.049
- Nieder, A. (2017). Evolution of cognitive and neural solutions enabling numerosity judgements: lessons from primates and corvids. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences*, 373(1740), 20160514. doi: 10.1098/rstb.2016.0514
- Nieuwenhuis, I., & Takashima, A. (2011). The role of the ventromedial prefrontal cortex in memory consolidation. *Behavioural Brain Research*, 218(2), 325-334. doi: 10.1016/j.bbr.2010.12.009
- Northcutt, R., & Kaas, J. (1995). The emergence and evolution of mammalian neocortex. *Trends In Neurosciences*, 18(9), 373-379. doi: 10.1016/0166-2236(95)93932-n

- Oh, S., Harris, J., Ng, L., Winslow, B., Cain, N., & Mihalas, S. et al. (2014). A mesoscale connectome of the mouse brain. *Nature*, 508(7495), 207-214. doi: 10.1038/nature13186
- Olkowicz, S., Kocourek, M., Lučan, R., Porteš, M., Fitch, W., Herculano-Houzel, S., & Němec, P. (2016). Birds have primate-like numbers of neurons in the forebrain. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 113(26), 7255-7260. doi: 10.1073/pnas.1517131113
- Onat, S., & Büchel, C. (2015). The neuronal basis of fear generalization in humans. *Nature Neuroscience*, 18(12), 1811-1818. doi: 10.1038/nn.4166
- Öngür, D. (2000). The Organization of Networks within the Orbital and Medial Prefrontal Cortex of Rats, Monkeys and Humans. *Cerebral Cortex*, 10(3), 206-219. doi: 10.1093/cercor/10.3.206
- Öngür, D., Ferry, A., & Price, J. (2003). Architectonic subdivision of the human orbital and medial prefrontal cortex. *The Journal Of Comparative Neurology*, 460(3), 425-449. doi: 10.1002/cne.10609
- Pavlov, I. (1927). *Conditioned Reflexes. An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex ... Translated and edited by G.V. Anrep*. Pp. xv. 430. Humphrey Milford: [London].
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Amsterdam: Elsevier.
- Pellman, B., & Kim, J. (2016). What Can Ethobehavioral Studies Tell Us about the Brain's Fear System?. *Trends In Neurosciences*, 39(6), 420-431. doi: 10.1016/j.tins.2016.04.001
- Petrides, M., Tomaiuolo, F., Yeterian, E., & Pandya, D. (2012). The prefrontal cortex: Comparative architectonic organization in the human and the macaque monkey brains. *Cortex*, 48(1), 46-57. doi: 10.1016/j.cortex.2011.07.002
- Peters, J., Kalivas, P., & Quirk, G. (2009). Extinction circuits for fear and addiction overlap in prefrontal cortex. *Learning & Memory*, 16(5), 279-288. doi: 10.1101/lm.1041309
- Peters, J., Dieppa-Perea, L., Melendez, L., & Quirk, G. (2010). Induction of Fear Extinction with Hippocampal-Infralimbic BDNF. *Science*, 328(5983), 1288-1290. doi: 10.1126/science.1186909
- Phelps, E., Delgado, M., Nearing, K., & LeDoux, J. (2004). Extinction Learning in Humans. *Neuron*, 43(6), 897-905. doi: 10.1016/j.neuron.2004.08.042
- Ragozzino, M., Detrick, S., & Kesner, R. (1999). Involvement of the Prelimbic–Infralimbic Areas of the Rodent Prefrontal Cortex in Behavioral Flexibility for Place and Response

- Learning. *The Journal Of Neuroscience*, 19(11), 4585-4594. doi: 10.1523/jneurosci.19-11-04585.1999
- Ronzoni, G., Antón, M., Mora, F., Segovia, G., & Del Arco, A. (2016). Infralimbic cortex controls the activity of the hypothalamus–pituitary–adrenal axis and the formation of aversive memory: Effects of environmental enrichment. *Behavioural Brain Research*, 297, 338-344. doi: 10.1016/j.bbr.2015.10.037
- Rozeske, R., Valerio, S., Chaudun, F., & Herry, C. (2014). Prefrontal neuronal circuits of contextual fear conditioning. *Genes, Brain And Behavior*, 14(1), 22-36. doi: 10.1111/gbb.12181
- Saffari, R., Teng, Z., Zhang, M., Kravchenko, M., Hohoff, C., Ambrée, O., & Zhang, W. (2016). NPY+/-, but not PV+-GABAergic neurons mediated long-range inhibition from infra- to prelimbic cortex. *Translational Psychiatry*, 6(2), e736-e736. doi: 10.1038/tp.2016.7
- Schacter, D., Eich, J., & Tulving, E. (1978). Richard Semon's theory of memory. *Journal Of Verbal Learning And Verbal Behavior*, 17(6), 721-743. doi: 10.1016/s0022-5371(78)90443-7
- Seese, R., Chen, L., Cox, C., Schulz, D., Babayan, A., & Bunney, W. et al. (2013). Synaptic Abnormalities in the Infralimbic Cortex of a Model of Congenital Depression. *Journal Of Neuroscience*, 33(33), 13441-13448. doi: 10.1523/jneurosci.2434-13.2013
- Shultz, S., & Finlayson, L. (2010). Large body and small brain and group sizes are associated with predator preferences for mammalian prey. *Behavioral Ecology*, 21(5), 1073-1079. doi: 10.1093/beheco/arq108
- Sierra-Mercado, D., Padilla-Coreano, N., & Quirk, G. (2010). Dissociable Roles of Prelimbic and Infralimbic Cortices, Ventral Hippocampus and Basolateral Amygdala in the Expression and Extinction of Conditioned Fear. *Neuropsychopharmacology*, 36(2), 529-538. doi: 10.1038/npp.2010.184
- Slattery, D., Neumann, I., & Cryan, J. (2010). Transient inactivation of the infralimbic cortex induces antidepressant-like effects in the rat. *Journal Of Psychopharmacology*, 25(10), 1295-1303. doi: 10.1177/0269881110368873
- Sotres-Bayon, F., & Quirk, G. (2010). Prefrontal control of fear: more than just extinction. *Current Opinion In Neurobiology*, 20(2), 231-235. doi: 10.1016/j.conb.2010.02.005
- Spalding, K. (2018). The role of the medial prefrontal cortex in the generalization of conditioned fear. *Neuropsychology*, 32(1), 1-17. doi: 10.1037/neu0000384
- Starosta, S., Güntürkün, O., & Stüttgen, M. (2013). Stimulus-Response-Outcome Coding in the Pigeon Nidopallium Caudolaterale. *Plos ONE*, 8(2), e57407. doi: 10.1371/journal.pone.0057407

- Stern, C., Gazarini, L., Vanvossen, A., Hames, M., & Bertoglio, L. (2013). Activity in prelimbic cortex subserves fear memory reconsolidation over time. *Learning & Memory*, 21(1), 753-759. doi: 10.1101/lm.032631.113
- Szyszkka, P., Demmler, C., Oemisch, M., Sommer, L., Biergans, S., & Birnbach, B. et al. (2011). Mind the Gap: Olfactory Trace Conditioning in Honeybees. *Journal Of Neuroscience*, 31(20), 7229-7239. doi: 10.1523/jneurosci.6668-10.2011
- Tissir, F., Lambert de Rouvroit, C., & Goffinet, A. (2002). The role of reelin in the development and evolution of the cerebral cortex. *Brazilian Journal Of Medical And Biological Research*, 35(12), 1473-1484. doi: 10.1590/s0100-879x2002001200007
- Troyner, F., Bicca, M., & Bertoglio, L. (2018). Nucleus reuniens of the thalamus controls fear memory intensity, specificity and long-term maintenance during consolidation. *Hippocampus*, 28(8), 602-616. doi: 10.1002/hipo.22964
- Tsutsui-Kimura, I., Ohmura, Y., Izumi, T., Matsushima, T., Amita, H., & Yamaguchi, T. et al. (2016). Neuronal codes for the inhibitory control of impulsive actions in the rat infralimbic cortex. *Behavioural Brain Research*, 296, 361-372. doi: 10.1016/j.bbr.2015.08.025
- VanElzakker, M., Kathryn Dahlgren, M., Caroline Davis, F., Dubois, S., & Shin, L. (2014). From Pavlov to PTSD: The extinction of conditioned fear in rodents, humans, and anxiety disorders. *Neurobiology Of Learning And Memory*, 113, 3-18. doi: 10.1016/j.nlm.2013.11.014
- Vanvossen, A., Portes, M., Scoz-Silva, R., Reichmann, H., Stern, C., & Bertoglio, L. (2017). Newly acquired and reactivated contextual fear memories are more intense and prone to generalize after activation of prelimbic cortex NMDA receptors. *Neurobiology Of Learning And Memory*, 137, 154-162. doi: 10.1016/j.nlm.2016.12.002
- Vertes, R. (2003). Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse*, 51(1), 32-58. doi: 10.1002/syn.10279
- Vidal-Gonzalez, I., Vidal-Gonzalez, B., Rauch, S., & Quirk, G. (2006). Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. *Learning & Memory*, 13(6), 728-733. doi: 10.1101/lm.306106
- Watanabe, H., & Mizunami, M. (2007). Pavlov's Cockroach: Classical Conditioning of Salivation in an Insect. *Plos ONE*, 2(6), e529. doi: 10.1371/journal.pone.0000529
- West, E., Saddoris, M., Kerfoot, E., & Carelli, R. (2014). Prelimbic and infralimbic cortical regions differentially encode cocaine-associated stimuli and cocaine-seeking before and following abstinence. *European Journal Of Neuroscience*, 39(11), 1891-1902. doi: 10.1111/ejn.12578

- Wiltgen, B., & Silva, A. (2018). Memory for context becomes less specific with time. *Learning & Memory*, 14, 313-317. doi: 10.1101/lm.430907.
- Wilson, C., Gaffan, D., Browning, P., & Baxter, M. (2010). Functional localization within the prefrontal cortex: missing the forest for the trees?. *Trends In Neurosciences*, 33(12), 533-540. doi: 10.1016/j.tins.2010.08.001
- Xu, W., & Sudhof, T. (2013). A Neural Circuit for Memory Specificity and Generalization. *Science*, 339(6125), 1290-1295. doi: 10.1126/science.1229534
- York, G., & Steinberg, D. (2006). An Introduction to the Life and Work of John Hughlings Jackson. *Medical History*, 50(S26), 1-34. doi: 10.1017/s0025727300071994
- Zavala, A. (1968). Classical Conditioning in Frogs (*Rana pipiens*). *Journal Of Herpetology*, 1(1/4), 83. doi: 10.2307/1563265
- Yue, L., Ma, L., Cui, S., Liu, F., Yi, M., & Wan, Y. (2017). Brain-derived neurotrophic factor in the infralimbic cortex alleviates inflammatory pain. *Neuroscience Letters*, 655, 7-13. doi: 10.1016/j.neulet.2017.06.028
- Zeeb, F., Baarendse, P., Vanderschuren, L., & Winstanley, C. (2015). Inactivation of the prelimbic or infralimbic cortex impairs decision-making in the rat gambling task. *Psychopharmacology*, 232(24), 4481-4491. doi: 10.1007/s00213-015-4075-y
- Zelikowsky, M., Bissiere, S., Hast, T., Bennett, R., Abdipranoto, A., Vissel, B., & Fanselow, M. (2013). Prefrontal microcircuit underlies contextual learning after hippocampal loss. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 110(24), 9938-9943. doi: 10.1073/pnas.1301691110